

DER EINFLUSS VON FRUKTOSE- UND
SORBITINFUSIONEN AUF DIE
INTRAERYTHROZYTÄRE
2,3-DIPHOSPHOGLYZERAT-KONZENTRATION
BEI NORMALPERSONEN

121

Bernhard Rothenfußer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Forschergruppe Diabetes und der III. Medizinischen
Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing
Chefarzt: Professor Dr. H. Mehnert

DER EINFLUSS VON FRUKTOSE- UND SORBITINFUSIONEN AUF DIE
INTRAERYTHROZYTÄRE 2,3-DIPHOSPHOGLYZERAT-KONZENTRATION
BEI NORMALPERSONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Rothenfuß
aus München

1976

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1976



Einleitung	1
I. Die Bedeutung der Kunst	2
II. Die Kunst als Ausdruck des Lebens	3
III. Die Kunst als Spiegel der Zeit	4
IV. Die Kunst als Quelle der Inspiration	5
V. Die Kunst als Mittel der Erziehung	6
VI. Die Kunst als Form der Selbsterkenntnis	7
VII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	8
VIII. Die Kunst als Quelle der Freude	9
IX. Die Kunst als Form der menschlichen Kommunikation	10
X. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	11
XI. Die Kunst als Form der menschlichen Kreativität	12
XII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Liebe	13
XIII. Die Kunst als Form der menschlichen Hoffnung	14
XIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Trauer	15
XV. Die Kunst als Form der menschlichen Sehnsucht	16
XVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einsamkeit	17
XVII. Die Kunst als Form der menschlichen Verbundenheit	18
XVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Identität	19
XIX. Die Kunst als Form der menschlichen Reflexion	20
XX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Existenz	21
XXI. Die Kunst als Form der menschlichen Transzendenz	22
XXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Immanenz	23
XXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Harmonie	24
XXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	25
XXV. Die Kunst als Form der menschlichen Einheit	26
XXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	27
XXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Ganzheit	28
XXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	29
XXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Vollständigkeit	30
XXX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	31
XXXI. Die Kunst als Form der menschlichen Bestenheit	32
XXXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unbestenheit	33
XXXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Glückseligkeit	34
XXXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unglückseligkeit	35
XXXV. Die Kunst als Form der menschlichen Seligkeit	36
XXXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unseligkeit	37
XXXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Heiligkeit	38
XXXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unheiligkeit	39
XXXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Gerechtigkeit	40
XL. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	41
XLI. Die Kunst als Form der menschlichen Barmherzigkeit	42
XLII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Barbarei	43
XLIII. Die Kunst als Form der menschlichen Güte	44
XLIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Bosheit	45
XLV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmut	46
XLVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	47
XLVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	48
XLVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Hartnäckigkeit	49
XLIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	50
L. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	51
LXI. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	52
LXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	53
LXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	54
LXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	55
LXV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	56
LXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	57
LXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	58
LXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	59
LXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	60
LXX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	61
LXXI. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	62
LXXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	63
LXXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	64
LXXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	65
LXXV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	66
LXXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	67
LXXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	68
LXXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	69
LXXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	70
LXXX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	71
LXXXI. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	72
LXXXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	73
LXXXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	74
LXXXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	75
LXXXV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	76
LXXXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	77
LXXXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	78
LXXXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	79
LXXXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	80
LXXXX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	81
LXXXXI. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	82
LXXXXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	83
LXXXXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	84
LXXXXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	85
LXXXXV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	86
LXXXXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	87
LXXXXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	88
LXXXXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	89
LXXXXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	90
LXXXXX. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	91
LXXXXXI. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	92
LXXXXXII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	93
LXXXXXIII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	94
LXXXXXIV. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	95
LXXXXXV. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	96
LXXXXXVI. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	97
LXXXXXVII. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	98
LXXXXXVIII. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Härte	99
LXXXXXIX. Die Kunst als Form der menschlichen Sanftmütigkeit	100

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	
EINLEITUNG	1
METHODEN	2
In-vivo-Versuche	2
Bestimmung des 2,3-Diphosphoglyzerats	3
Adenosintriphosphat-Bestimmung	5
Hämoglobin-Bestimmung	8
Pyruvat-Bestimmung	8
Laktat-Bestimmung	10
Glukose-Bestimmung	11
Fruktose-Bestimmung	12
Anorganische Phosphat-Bestimmung	13
Harnsäure-Bestimmung	14
Bestimmung der freien Fettsäuren	15
Polyol-Bestimmung	16
In-vitro-Versuche	17
Ergebnisse der in-vivo-Versuche	18
Ergebnisse der in-vitro-Versuche	26
DISKUSSION	
Stoffwechsel des Erythrozyten	33
Die Bedeutung des 2,3-Diphosphoglyzerats	41
Regulation des 2,3-Diphosphoglyzerats	45
Der Stoffwechsel unter dem Einfluß von Fruktose, Sorbit und Xylit	51
DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE	60
ZUSAMMENFASSUNG	64
LITERATURVERZEICHNIS	66
LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGEN

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintriphosphat
1,3-DPG	1,3-Diphosphoglyzerat
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglyzerat
GAP-DH	Glyzerinaldehyd-Dehydrogenase
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion
Hb	Hämoglobin
HK	Hexokinase
IMP	Inosinmonophosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
L/P	Laktat/Pyruvat
M	Mol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
P _i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
2-PG	2-Phosphoglyzerinsäure
3-PG	3-Phosphoglyzerinsäure
PGK	Phosphoglyzerat-Kinase
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzen- tration
PHI	Phosphohexoseisomerase
PK	Pyruvat-Kinase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
TCA	Trichloressigsäure
TRAM-Puffer	Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer
TRIS-Puffer	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan (THAM)

EINLEITUNG

Kohlenhydrate, insbesondere Glukose, bilden die wichtigsten Kalorienträger einer Infusionstherapie. Bei der diabetischen Stoffwechselstörung, aber auch bei chronischen Leberkrankheiten, ist die Verwertung der Glukose jedoch eingeschränkt. Bei solchen Patienten hat sich die parenterale Zufuhr von sogenannten Zuckeraustauschstoffen, nämlich Fruktose, Sorbit und Xylit, als vorteilhaft gegenüber von Glukose erwiesen (52); sie werden zu mehr als 80 Prozent insulinunabhängig in den Stoffwechsel der Leber eingeschleust (28). Mit einem gewissen zeitlichen Verzögerungseffekt entsteht aus den Ersatzzuckern in der Leber hauptsächlich Glukose, so daß die weitere Metabolisierung nicht mehr insulinunabhängig verläuft. Jedenfalls verhindert jedoch die Infusion von Zuckeraustauschstoffen einen unerwünscht raschen Glukoseanstieg im Blut und gewährleistet gleichzeitig die Versorgung mit Glukose, auf die der menschliche Körper ja angewiesen ist.

In letzter Zeit wurde auch über Nebenwirkungen der parenteralen Verwendung von Zuckeraustauschstoffen berichtet: Anstieg der Laktatkonzentration im Blut, vorübergehende Hyperurikämie und Abfall des hepatischen Adenosintriphosphat (ATP)-Gehalts. Standl und Kolb zeigten, daß unter Fruktose- und Sorbitinfusion die ATP-Konzentration der Erythrozyten unverändert blieb, während das mengenmäßig am meisten ins Gewicht fallende energiereiche Phosphat der roten Blutkörperchen, das 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG), stark abnahm (77). Erniedrigte 2,3-DPG-Konzentrationen erhöhen die Affinität der Sauerstoffbindung an das Hämoglobin und vermindern auf diese Weise die Fähigkeit der Erythrozyten, Sauerstoff in der Mikrozirkulation abzugeben. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den in-vivo-Effekt von Fruktose- und Sorbitinfusionen auf den Erythrozytengehalt von ATP und 2,3-DPG genauer zu untersuchen.

Außerdem sollte anhand von in-vitro-Studien festgestellt werden, ob es sich dabei um direkte oder indirekte Auswirkungen von Fruktose und Sorbit auf die energiereichen Phosphate des Erythrozyten handelt.

METHODEN

In-vivo-Versuche

Untersucht wurden insgesamt 15 stoffwechselgesunde Versuchspersonen (Frauen und Männer) im Alter zwischen 26 und 54 Jahren. Keiner der Betreffenden litt an einer Anämie, respiratorischer oder Niereninsuffizienz oder an einer Störung des Säure-Basen-Haushalts. Die Probanden wurden nach 15stündigem Fasten im Liegen entweder mit Fruktose oder mit Sorbit infundiert.

Man unterscheidet daher 2 Gruppen: Gruppe I (9 Personen) wurde Fruktose, Gruppe II (6 Personen) wurde Sorbit als Dauerinfusion intravenös mit einer Dosierung von 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde über eine Zeitspanne von insgesamt 3 Stunden verabreicht. Im venösen Blut wurden zum Zeitpunkt 0 (also vor der Infusion) sowie 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten nach Infusionsbeginn folgende Metabolite gemessen:

Im Erythrozyten wurden die Konzentrationen des 2,3-DPG (57), des ATP (46) und Hämoglobin (34) bestimmt. Im Serum wurden die Konzentrationen von Pyruvat (20), Laktat (41), Glukose (70), Fruktose (70), Polyol (81), unveresterten freien Fettsäuren (24), Harnsäure (45) und anorganischem Phosphat (33) nachgewiesen.

Bei acht Personen der Gruppe I wurden noch gleichzeitig zu den oben aufgeführten Parametern mit Hilfe eines Blutgasanalysators (Corning-EEL Model 165) in Dreifachwerten der venöse Blut-pH, das aktuelle Bikarbonat und der $p\text{CO}_2$ während der gesamten Infusionsdauer bestimmt.

Die Aufnahme von Fruktose und Sorbit durch die Erythrozyten während der Infusionen konnte demonstriert werden. Erythrozytenkonzentrat wurde zweimal mit kalter isotoner Salzlösung gewaschen und anschließend mit 5prozentiger Trichloressigsäure enteiweißt. In den Erythrozyten konnte nun annähernd die gleiche Konzentration von Fruktose und Polyol gefunden werden wie in

der entsprechenden Blutprobe; dies bedeutet, daß ein rascher Austausch dieser beiden Kohlenhydrate durch die Erythrozytenmembran erfolgt.

Bestimmung des 2,3-Diphosphoglyzerats

Zur Bestimmung von 2,3-DPG und ATP bedurfte es einer besonderen Behandlung des Blutes.

Zur Enteiweißung wurden jeweils 0,5 ml Vollblut mit 2 ml 5prozentiger Trichloressigsäure (TCA) versetzt (Verdünnung 1 : 5). Um eine möglichst vollständige Extraktion von 2,3-DPG und ATP aus den Erythrozyten zu erreichen, wurde eine Magnetkugel in das Reagenzglas zugegeben, mit einem automatischen Schüttler eine Minute und anschließend mit einem Magnetrührer fünf Minuten gut durchgemischt. Nach fünf Minuten Zentrifugation (Heraeus Christ 71 Typ UJ 1 3600 U/min) wurde der klare Überstand, Extraktion I, in ein 1,5 ml Plastikröhrchen pipettiert. Der zurückbleibende braune Niederschlag wurde nochmals mit 2 ml 5prozentiger TCA (Verdünnung 1 : 5) nachextrahiert.

Ein zweiter Überstand, Extraktion II, wurde nach den gleichen Arbeitsgängen wie zuvor gewonnen und gesondert von Extraktion I bei -20°C tiefgefroren. Nach Vorversuchen hatte sich nämlich gezeigt, daß Extraktion I für sich allein nur 70 - 80 %, dagegen ein Gemisch aus Extraktion I und Extraktion II mehr als 95 % der Gesamtmenge an 2,3-DPG sowie ATP der Erythrozyten enthielten. Zur 2,3-DPG-Bestimmung wurden die Extraktionen I und II aufgetaut und jeweils 0,1 ml in ein Reagenzglas pipettiert. Zur Neutralisation wurden 0,2 ml 2 M Tris-Puffer, pH 7,4 zugegeben und anschließend mit 1,6 ml destilliertem Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt (Verdünnung 1 : 10). Bei 10 Kontrollversuchen mit einem geeichten pH-Meter wurden pH-Werte von durchschnittlich 7,44 (Streubreite 7,44 - 7,45) gemessen. Damit konnte eine vollstän-

dige Neutralisation der Proben garantiert werden. Das 2,3-DPG wurde nun nach der Methode von Nygaard (57) enzymatisch bestimmt.
[1]

- 1) 3-Phosphoglyzerat $\xrightarrow[\text{Phosphoglyzeratmutase}]{2,3\text{-DPG}}$ 2-Phosphoglyzerat
- 2) 2-Phosphoglyzerat $\xrightarrow[\text{Enolase}]{} \text{Phosphoenolpyruvat}$
- 3) Phosphoenolpyruvat + ADP $\xrightarrow[\text{Pyruvatkinase}]{\text{Mg}^{++}}$ Pyruvat + ATP
- 4) Pyruvat + NADH
(colored at 340 nm) $\xrightarrow[\text{Laktatdehydrogenase}]{} \text{Laktat} + \text{NAD}$
(colorless at 340 nm)

2,3-DPG katalysiert als notwendiges Ko-Enzym die Phosphoglyzeratmutase-Reaktion (1). Reaktion 2 und 3 sind Hilfsreaktionen für die Indikator-Reaktion 4, in der die Abnahme der Absorption von NADH im Photometer bei einer Wellenlänge von 334 nm gemessen wird. Die Absorptionsänderung (ΔA für 4 Minuten) ist der 2,3-DPG-Konzentration in der Probe direkt proportional.

Zur Messung wurde die fertige Enzym-Substrat-Packung von Calbiochem (Katalog Nummer 869237) benutzt. 480 μ l der fertigen Lösung wurden in eine Halbmikroküvette mit 1,0 cm Schichtdicke pipettiert, 2 Minuten im Küvettenhalter auf 25° C erwärmt - der Test ist sehr temperaturempfindlich - und dann 20 μ l der vorher bereiteten Probe zugegeben (Verdünnung 1 : 25).

Gemessen wurde mit einem Eppendorff-Photometer über 4 Minuten bei einer Wellenlänge von 334 nm. Ein gekoppelter Kompensationschreiber im normalen Empfindlichkeitsbereich (Spreizung 1 : 1, Geschwindigkeit 1 cm/min) zeichnete die Extinktionsabnahme auf. Zur Berechnung der 2,3-DPG-Konzentrationen wurde eine Eichkurve aus 2 definierten 2,3-DPG-Mengen, nämlich 1,0 und 0,5 mMol/ml aus einem 1 : 100 verdünnten Standard (2,5 μ M/ml) aufgestellt. In dieser wurde die 2,3-DPG-Menge gegen die Extinktionsänderung

aufgetragen und die für die Proben erhaltenen Werte eingesetzt. Die abgelesenen Werte der 2,3-DPG-Mengen wurden auf Gramm Hämoglobin bezogen.

Eine eigene Fehlerquellenstudie, die wegen des hohen Verdünnungsfaktors von 2500 angestellt wurde, zeigte durch Mehrfachbestimmungen bei einer durchschnittlichen 2,3-DPG-Konzentration von 13,08 $\mu\text{Mol/g Hb}$ eine Fehlerstreuung von 0,37 $\mu\text{Mol/g Hb}$ (= 2,8 %) bis maximal 0,53 $\mu\text{Mol/g Hb}$ (= 4,1 %) bei einem durchschnittlichen Hämoglobingehalt von 14,56 g%. Rechnet man eine Streubreite des Hb-Werts von durchschnittlich 0,275 g%, die durch Doppelwertbestimmung möglichst nieder gehalten wurde, ab oder dazu, so ergibt sich ein Fehler von 0,29 $\mu\text{Mol/gHb}$ (= 2,2 %) bis maximal 0,61 $\mu\text{Mol/g Hb}$ (= 4,7 %). Außerdem wurden noch Doppelversuche mit gesonderten 2,3-DPG- und Hb-Messungen durchgeführt. Hier zeigte sich eine Streuung von 0,41 $\mu\text{Mol/g Hb}$ (= 3,2 %) bis 0,75 $\mu\text{Mol/gHb}$ (= 5,8 %).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Fehlerquote bei der 2,3-DPG-Messung bezogen auf seine Bezugsgröße g Hb zwischen 2,2 und 5,8 % lag, also durchschnittlich bei 4 %.

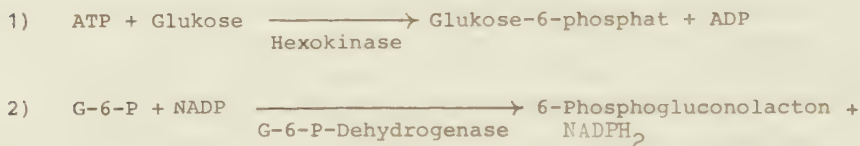
Adenosintriphosphatbestimmung

Wie einleitend bei der 2,3-DPG-Bestimmung beschrieben, wurden die Extraktionen I und II als Ausgangslösungen auch für die ATP-Bestimmung benutzt, die wegen der Labilität von ATP - trotz tiefgefrorenen Zustands bei -20°C - nicht später als einen Monat nach einem Infusionsversuch durchgeführt wurde.

Nach dem Auftauen beider Extraktionen wurden jeweils 0,5 ml von Extraktion I und Extraktion II zusammen in ein Reagenzglas pipettiert und die Trichloressigsäure zweimal mit vier Volumenteilen Diäthyläther ausgeschüttelt. Dadurch stieg der anfängliche pH-Wert von unter 1 auf pH 3 - 4, was orientierend mit pH-

Papier überprüft wurde. Bei pH-Werten unter 3, verläuft die anschließende Neutralisation durch den TRAM-Puffer in der Küvette nur unvollständig, und der enzymatische Test, der nach der Methode von Lamprecht und Trautschold (46) durchgeführt wurde, ist gestört.

[2]



In Gleichung 1 wird ATP verbraucht und in Gleichung 2 wird NADPH_2 , das im Gegensatz zu NADP eine hohe Extinktion um 340 nm (334 - 366 nm) aufweist, neu gebildet. Pro Mol ATP entsteht also ein Mol NADPH_2 , dessen Zunahme mit dem Eppendorff-Photometer bei einer Wellenlänge von 334 nm und einer Temperatur von 25° C in Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen und vom Kompensationsschreiber (Spreizung 1 : 4, Geschwindigkeit 1 cm/min) aufgezeichnet wurde.

An Reagenzien wurden benutzt:

- 1) Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer
(TRAM) 0,05 M, pH 7,6
- 2) NADP 0,007 M
- 3) Magnesiumchlorid (MgCl_2) 0,1 M
- 4) Glukose 0,05 M
- 5) Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase 1 mg Protein/ml
- 6) Hexokinase 2 mg Protein/ml

In die Küvette pipettierte man nun 0,7 ml TRAM, 0,1 ml MgCl_2 ,

50λ NADP und 200λ der, wie oben beschrieben, hergestellten Probe. Nach Vorwärmen auf 25° C kontrollierte man über eine Minute die Konstanz der Extinktion, gab dann 5λ Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase dazu, kontrollierte nochmals die Konstanz, las nach anschließender Glukosezugabe von 20λ die Extinktion sofort ab, um den Fehler - bedingt durch Hexokinasereste in der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Lösung - auf ein Minimum zu halten, und startete schließlich mit 10λ Hexokinase. Obgleich die Fremdaktivität der Hexokinase in den Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Präparaten weniger als 0,1 % beträgt, wird dennoch durch Glukosezusatz ein, wenn auch kleiner, ATP-Umsatz ausgelöst (Δ E ca. 0,002/min). Zwischen Glukose- und Hexokinasezugabe sollten nicht mehr als 30 Sekunden Zeitdifferenz liegen. Die Extinktionsänderung ist nach 3 - 5 Minuten abgeschlossen. Die Intaktheit der Hilfsenzyme wie der anderen Reagenzien wurde zu Beginn jeder Meßreihe mit einer ATP-Standardlösung (1 mM/l) überprüft.

Die Konzentrationen von ATP wurden durch Anwendung mit dem erweiterten Lambert-Beer'schen Gesetz aus den Extinktionsänderungen berechnet.

Folgende Formel gilt:

[3]

$$c = \frac{\Delta E \cdot EV \cdot F}{\epsilon \cdot d \cdot PV \cdot S}$$

$$c = \frac{\Delta E \cdot 1,085 \cdot 10}{6,22 \cdot 1 \cdot 0,2 \cdot 4}$$

$$c = \Delta E \cdot 2,18$$

c = Konzentration (μMol/ml)

ΔE = Extinktionsänderung

ε = Molekularer Extinktionskoeffizient für NADPH (Mol⁻¹ cm⁻¹)

d = Schichtdicke (cm)

F = Verdünnung des Bluts (Extraktion I und II)

EV = Endvolumen (ml)

PV = Proben-Volumen (ml)

S = Spreizung des Kompensations-schreibers

Die erhaltenen ATP-Werte in $\mu\text{Mol/ml}$ wurden auf Gramm Hämoglobin bezogen.

Hämoglobin-Bestimmung

Die Hämoglobin-Bestimmung wurde nach der Zyanmethämoglobinmethode ausgeführt (34). Das Prinzip dieser Methode ist, daß Kalium-Ferrizyanid das Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiert, welches dann mit Kalium-Zyanid in den sehr stabilen Farbstoff Hämiglobin-Zyanid übergeführt wird. Als Reagenz verwendeten wir die modifizierte Drabkin'sche Lösung, die sich wie folgt zusammensetzt:

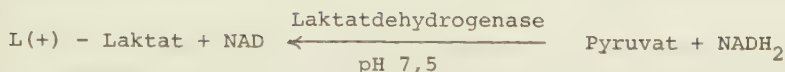
Kalium-Zyanid	0,05 g
Kalium-Ferrizyanid	0,2 g
Monokalium-Dihydrogen-Phosphat	0,14 g
Sterox	0,5 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml

5,0 ml modifizierte Drabkin'sche Lösung wurden in ein sauberes Reagenzglas gegeben, 0,02 ml Blut eingeblasen und zweimal nachgespült. Nach 30 Minuten Stehen im Dunkeln bei Zimmertemperatur wurde die Extinktion in einer Halbmikroküvette (Schichtdicke 1 cm) bei 540 nm gegen Drabkin'sche Lösung abgelesen. Aus den abgelesenen Extinktionswerten ermittelte man anhand einer Tabelle die aktuelle Hämoglobinmenge pro 100 ml Blut.

Pyruvat-Bestimmung

Pyruvat wurde enzymatisch mit Hilfe des Laktatdehydrogenase-Systems bestimmt (20).

[4]



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt stark nach links verschoben. Somit kann das oben stehende System mit NAD als Indikator direkt für den Pyruvat-Nachweis eingesetzt werden.

Folgende Reagenzien wurden verwandt:

Perchlorsäure-Lösung	10 %ig
Trikaliumphosphat-Lösung	23,7 g in aqua dest. ad 100,0
NADH ₂ -Lösung	60 mg/10 ml
Laktatdehydrogenase-Lösung	1000 E/ml

Frisch entnommenes Blut (5,0 ml) wurde sofort zur Enteiweißung mit Perchlorsäure (5,0 ml) versetzt, die anschließend vom abzentrifugierten Überstand (3,0 ml) mit Trikaliumphosphat-Lösung (1,5 ml) als unlösliches Kaliumperchlorat ausgefällt wurde. Filtrat (2,0 ml) und NADH₂ (0,1 ml) ergab den Wert von Extinktion E₁. Nach dem Start der Reaktion mit Laktatdehydrogenase (0,02 ml) wurde der Stillstand der Reaktion abgewartet (ca. 5 - 10 Minuten) und Extinktion E₂ bestimmt.

Gemessen wurde die NADH-Abnahme im Photometer bei 366 nm im Halbmikroverfahren bei 25° C. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

[5]

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{EV}{PV} \quad (\mu\text{Mol/ml})$$

c = Konzentration (μMol/ml)

ΔE = Extinktionsänderung (E₁ - E₂)

ε = Molarer Extinktionskoeffizient (Mol⁻¹ cm⁻¹)

d = Schichtdicke (cm)

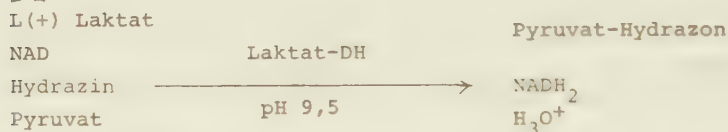
EV = Endvolumen (ml)

PV = Probenvolumen (ml)

Laktat-Bestimmung

Der Laktatnachweis erfolgte ähnlich dem von Pyruvat mit Laktatdehydrogenase und NAD als Indikator (41). Das Gleichgewicht für die Erfassung des Laktats liegt aber so ungünstig, daß die Reaktionsprodukte Pyruvat und H^+ aus dem System abgefangen werden müssen. Dies geschieht durch Überführen des Pyruvats in das Hydrazon und Auffangen der Protonen in einem stark alkalischen Puffer:

[6]



Die Zunahme des NADH₂ - meßbar bei 366 nm - ist der vorliegenden Laktatkonzentration direkt proportional.

Folgende Reagenzien wurden verwandt:

Perchlorsäure-Lösung	10 %ig
Glyzin/Hydrazinpuffer (0,5 M Glyzin/0,4 M Hydrazin, pH = 9)	
Laktatdehydrogenase-Lösung	1000 E/ml
NAD-Lösung	200 mg/10 ml

Frisch entnommenes Blut (1,0 ml) wurde mit Perchlorsäure (1,0 ml) versetzt, gemischt und abzentrifugiert. Überstand (0,1 ml), Glyzin/Hydrazinpuffer (2,0 ml), Laktatdehydrogenase (0,02 ml) und NAD (0,2 ml) wurden zusammenpipettiert. Nach 60 Minuten bei Zimmertemperatur wurde bei 366 nm die Extinktion E (P) gegen Wasser abgelesen. Wichtig ist die Mitbestimmung des Leerwerts E(L).

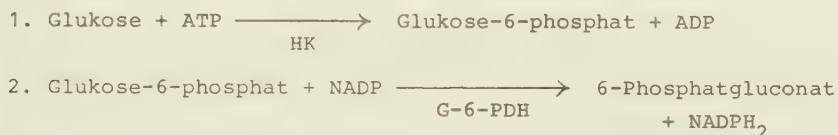
Die Berechnung erfolgte wie beim Pyruvat nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. (siehe dort)

$$E = E(P) - E(L)$$

Glukose-Bestimmung

Die Glukose-Bestimmung wurde enzymatisch mit Hexokinase (HK) und Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) durchgeführt (70). Bei der Reaktion spielen sich folgende Vorgänge ab:

[7]



Liegen ATP, Hexokinase, NADP und Glukose-6-phosphatdehydrogenase im Überschuß vor, so entspricht ein Molekül gebildetes NADPH_2 einem Molekül Glukose.

An Reagenzien wurden verwandt:

Perchlorsäure	3 %ig (0,33 M)
Triäthanolaminpuffer	0,3 M, pH 7,5; Zusatz von 3 mM Magnesiumsulfat
NADP-Lösung	0,012 M
ATP-Lösung	0,016 M
Enzymgemisch	1 mg HK und 2 mg G-6-PDH pro ml

Der Überstand (0,2 ml) aus der Enteiweißung (0,1 ml Blut mit 1,0 ml Perchlorsäure) wurde mit Triäthanolaminpuffer (2,0 ml), NADP-Lösung (0,02 ml) und ATP-Lösung (0,02 ml) zusammenpipettiert und gemischt. Nach der Leerwertbestimmung E(L) wurde die Reaktion durch Zusatz des Enzymgemisches (0,01 ml) gestartet, Stillstand (nach ca. 10 Minuten) abgewartet und dann der Probenwert E(P) bei Hg 366 nm gemessen.

Die Berechnung erfolgte nach dem erweiterten Lambert-Beer'schen Gesetz mit dem Molekulargewicht von Glukose:

[8]

$$c = \frac{E(P) - E(L)}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{EV}{PV} \cdot \frac{MG}{10} \quad 1000 \text{ (mg/100 ml)}$$

$$c = \Delta E \cdot 864 \text{ mg/100 ml}$$

- c = Konzentration (mg%)
 ΔE = Extinktionsänderung, $E(P) - E(L)$
 ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient ($\text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 d = Schichtdicke (cm)
 EV = Endvolumen (ml)
 PV = Probenvolumen (ml)
 MG = Molekulargewicht (Glukose = 180,16)

Fruktose-Bestimmung

Der Fruktosenachweis ist ähnlich dem von Glukose. Er erfolgt enzymatisch mit Hexokinase (HK), Phosphohexoselisomerase (PHI) und Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) (70).

Dabei laufen folgende drei Reaktionen ab:

[9]

1. Fruktose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Fruktose-6-phosphat
2. Fruktose-6-phosphat $\xrightarrow{\text{PHI}}$ Glukose-6-phosphat
3. Glukose-6-phosphat + NADP $\xrightarrow{\text{G-6-PDH}}$ 6-Phosphogluconat + NADPH₂

Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Hexosen; dabei wird auch Fruktose zu Fruktose-6-phosphat übergeführt (Reaktion

1). Glukose wird vorher im gleichen Ansatz als G-6-P mit Glukose-6-phosphatdehydrogenase bestimmt (siehe Glukose-Bestimmung). Anschließend führt man Fruktose-6-phosphat durch Zusatz von Hexosephosphatisomerase in Glukose-6-phosphat über (Reaktion 2) und bestimmt es dann als solches im gleichen Ansatz mit (Reaktion 3). Die Zunahme der Extinktion nach Zusatz von Hexosephosphatisomerase ist der Konzentration der Fruktose im Ansatz proportional.

In der Praxis wurde zuerst eine Glukose-Bestimmung (siehe dort) durchgeführt. Extinktion E(P) für Glukose bildete den Leerwert E(L). Mit 0,005 ml Phosphohexoseisomerase-Lösung (10 mg Protein/ml) wurde gestartet und nach 10 Minuten der Probenwert E(P) gemessen.

Da Fruktose das gleiche Molekulargewicht hat wie Glukose, erfolgt die Berechnung in der gleichen Art.

Anorganische Phosphat-Bestimmung

Der anorganische Phosphor im Plasma wurde nach der Molybdänblau-Methode bestimmt (33), bei der das anorganische Phosphat mit Molybdänsäure in einen Phosphor-Molybdänsäure-Komplex übergeführt, durch Ascorbat zu kolloidalem Molybdänblau reduziert wird und als solches photometrisch bestimmt werden kann. Zusatz von Borax stabilisiert die Farbe, Natrium-Pyrosulfit verhindert eine unspezifische Komplexsalzbildung und Carbonat-Sulfit hält die Eiweiße in Lösung (Enteiweißung deshalb überflüssig). Das gebildete Molybdänblau ist proportional der Menge des vorhandenen anorganischen Phosphats.

Folgende Reagenzien wurden verwandt:

Pyrosulfit-Borat-Lösung: Borax 52 mM, Pyrosulfit 95 mM

Molybdänsäure-Lösung: Ammonium-Molybdat 40,5 mM, Schwefelsäure 0,5 M

Hydrochinon-Ascorbat-Lösung: Hydrochinon 90 mM, Ascorbat 5 mM

Carbonat-Sulfit-Lösung: Carbonat 396 mM, Sulfit 56 mM

Phosphor-Standard: 5 mg P/100 ml

In Reagenzgläser wurden pipettiert: Pyrosulfit-Borat-Lösung (0,2 ml), Molybdänsäure-Lösung (0,05 ml) und Hydrochinon-Ascorbat-Lösung (0,05 ml). Für den Probenwert E(P) kamen abzentrifugiertes Plasma (0,02 ml), den Standardwert E(St) Phosphor-Standard (0,02 ml) und den Reagenzien-Leerwert E(RL) aqua dest. (0,02 ml) dazu. 15 Minuten wurden die Reagenzgläser abgedeckt bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach pipettierte man Carbonat-Sulfit-Lösung (0,5 ml) dazu und mischte, bis der Niederschlag vollständig aufgelöst war. Nach weiteren 15 Minuten konnten die Extinktionen bei 578 nm als Mikromethode bei 25° C gemessen werden.

Die Phosphat-Konzentration wurde mit dem Phosphatstandard in mg% berechnet:

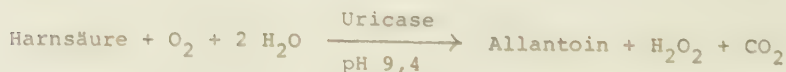
[10]

$$c = \frac{E(P) - E(RL)}{E(St) - E(RL)} \cdot 5 \text{ mg/100 ml}$$

Harnsäure-Bestimmung

Der Harnsäurenachweis beruhte auf der uricasekatalysierten Oxidation von Harnsäure zu Allantoin (45, 61):

[11]



Harnsäure hat sein Extinktionsmaximum bei 293 nm. Von der bei obiger Reaktion auftretenden Extinktionsabnahme bei 293 nm kann direkt auf die vorliegende Harnsäure-Konzentration geschlossen werden.

Folgende Reagenzien wurden benutzt:

Amediolpuffer, 50 mM, pH 9,4, EDTA 5 mM

Uricase-Lösung, 1 mg/1,5 ml

Standard-Lösung, 5 mg/100 ml

Zur Konzentrationsberechnung bedarf es fünf verschiedener Ansätze: Proben (P), Probenleerwert (PL), Reagenzienleerwert (RL), Standard (St) und Standardleerwert (StL).

Nach 60minütigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde dann in Quarzküvetten bei 293 nm und 25° C abgelesen.

Die Harnsäurekonzentration berechnete sich mit Hilfe der Standardlösung:

$$c = \frac{[12] \cdot \left[\frac{E(PL) - E(P)}{E(StL) - E(St)} + \frac{E(RL)}{E(RL)} \right] \cdot 5 \text{ mg/100 ml}}{1}$$

Bestimmung der freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren wurden photometrisch nach der Methode von Duncombe bestimmt (24). Dabei werden die Fettsäuren mit zweiwertigen Kupfersalzen in die entsprechenden fettsauren Kupfersalze übergeführt, die als solche in Chloroform löslich sind und dementsprechend extrahiert werden können. Anschließend wird das als Salz der Fettsäuren in das Chloroform übergeführte Kupfer mit Thiocarbamat in einen intensiv gefärbten Komplex umgewandelt,

der photometrisch gemessen werden kann.

Benötigte Reagenzien:

Kupfernitratlösung, 0,2 M Kupfernitratlösung in 0,4 M Triäthanolamin-Essigsäure-Puffer, pH 7,3

Diäthylthiocarbamat-Lösung, Natriumsalz, 0,1 %ig in Butan-2-ol Standardlösung, 0,5 mval, pH 7,0

Chloroform (5,0 ml), Kupfernitratlösung (1,0 ml) und Serum (0,2 ml) wurden in ein Zentrifugenschliffglas pipettiert. Nach kräftigem Schütteln wurde der wässrige Überstand vorsichtig abgesogen. Chloroformrückstand (3,0 ml) wurde mit Diäthylthiocarbamatlösung (0,2 ml) zusammengegeben und nach 5 - 10 Minuten konnte bei 436 nm die Extinktion E(P) abgelesen werden.

Die Berechnung geschah mit Hilfe der Standardlösung E(St).

[13]

$$c = \frac{E(P)}{E(St)} \cdot 0,5 \text{ mval/L}$$

Polyol-Bestimmung

Zum Nachweis der Polyalkohole (Sorbit, Xylit, Maltit und Glycerin) wurde deren Oxydation zu Formaldehyd verwandt. Formaldehyd kann dann in stark saurem Milieu durch Reaktion mit Chromotropsäure photometrisch nachgewiesen werden (81).

Reagenzien:

Kaliumperjodat, 7,5 mM in 0,25 M Schwefelsäure

Zinn(II)chlorid, 35 mM in 0,33 M Salzsäure

Chromotropes Reagenz, 10,45 g Substanz in 60 ml 9M H₂SO₄
dazu 1100 ml Konz. H₂SO₄

Schwefelsäure, 10,5 M

Es wurde enteweißtes Serum (0,2 ml) und Kaliumperjodat (0,1 ml) in ein Reagenzglas pipettiert; nach kurzem Schütteln blieb die Probe genau 8 Minuten ruhig stehen. Dann kamen Zinnchlorid (0,1 ml) und chromotropes Reagenz (1,0 ml) dazu. Nach gutem Mischen wurde 30 Minuten bei 100° C in brodelndem Wasserbad gekocht, wieder abgekühlt und Schwefelsäure (1,0 ml) zugegeben. Die Extinktion E(P) wurde gegen den Leerwert bei einer Absorption von 578 nm abgelesen.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte bei gleicher Verdünnung eines Standards und der Probe (bei der Enteweißung) mit Hilfe der Standardlösung E(St):

$$c = \frac{E(P)}{E(St)} \quad \text{mg/100 ml}$$

In-vitro-Versuche

In-vitro-Versuche wurden durchgeführt, um einen möglichen direkten Effekt der Versuchs-Substanzen (Fruktose, Sorbit, Xylit, Laktat/Pyruvat [L/P] und anorganisches Phosphat) auf die 2,3-DPG- und ATP-Konzentration der Erythrozyten zu untersuchen. Stoffwechselgesunden Versuchspersonen wurde am Morgen vor dem Frühstück venöses Blut abgenommen und in heparinisierte Spritzen gefüllt. Je 3,0 ml Blut wurden in Plastikzentrifugengläsern mit je 12,0 ml isotonem 0,02 M Trispuffer vermischt der 8,0 g Natriumchlorid und 0,4 g Kaliumchlorid pro Liter enthielt und einen pH-Wert von 7,4 besaß (Verdünnung 1 : 5). Vorversuche mit Vollblut (ohne Verdünnung) hatten einen zu starken Laktat-Anstieg im Blut gezeigt, der möglicherweise einen Einfluß auf den pH-Wert und den Erythrozytenstoffwechsel hätte. Die Zentri-

fugengläser wurden in ein auf 37° C erwärmtes Wasserbad gestellt, wo das Blut unter Schütteln inkubiert wurde. Während der Inkubationsdauer (maximal 4 Stunden) blieb der pH-Wert konstant, und der pO_2 - mit einer geeichten Sauerstoff-Elektrode (A3 Potentiograph Eschweiler, Kiel) überprüft - wurde über 100 Torr gehalten. Die Laktat-Konzentration stieg kontinuierlich innerhalb von 4 Stunden von 0,2 auf maximal 0,75 mM an. Alle Proben wurden mit Glukose - in einer Basalkonzentration von 100 mg/100 ml - vorinkubiert, um ein mögliches durch die Blutverdünnung hervorgerufenen Defizit der Energieversorgung auszugleichen.

Nach einer halbstündigen Vorinkubation wurden die Testsubstanzen den verdünnten Blutproben dazugegeben und danach sofort 1,5 ml Blut-Puffer-Gemisch für die O-Wert-Bestimmung von 2,3-DPG, ATP und Hb entnommen. Weitere Entnahmen während der Inkubationsdauer bis zu 4 Stunden sind aus den Werte-Tabellen ersichtlich. Bei den Inkubationsversuchen wurde die Herstellung der Extraktionen, die zur 2,3-DPG- und ATP-Bestimmung benötigt werden (siehe dort), modifiziert. Anstatt 2 Extraktionen, wie bei den in-vivo-Versuchen, begnügte man sich bei den in-vitro-Versuchen mit einer einzigen Extraktion. Gewonnen wurde sie vom Überstand eines zentrifugierten Gemisches aus 1 ml Blut-Puffer-Verdünnung und 3 ml 5prozentiger Trichloressigsäure (Verdünnung 1 : 4). Nachextraktionen zeigten, daß diese eine Extraktion eine Ausbeute der Testsubstanzen von durchschnittlich 93 % bringt. Die Bestimmungen von 2,3-DPG, ATP und Hb wurden unter Berücksichtigung des geringfügig veränderten Verdünnungsfaktors wie vorher beschrieben durchgeführt (siehe 2,3-DPG-, ATP- und Hb-Bestimmung).

Ergebnisse der in-vivo-Versuche

Während der intravenösen Fruktosebelastungen von 0,5 g pro kg Körpergewicht und Stunde wurde das Verhalten von Glukose, Fruktose und unveresterten Fettsäuren im venösen Blut über einen

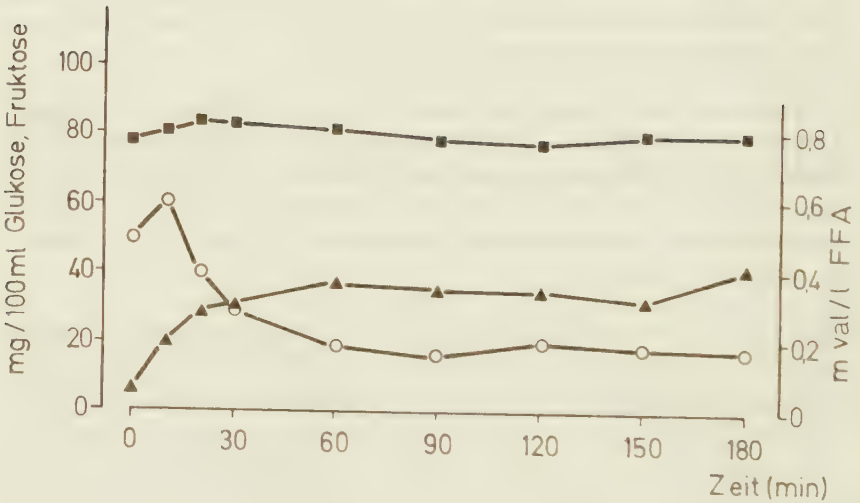
Zeitraum von 3 Stunden verfolgt (Abbildung 1). Die Blutglukose stieg im Mittel innerhalb der ersten 30 Minuten geringfügig an, nahm im weiteren Verlauf der Infusion kontinuierlich etwas ab und erreichte nach 180 Minuten wieder ihren Ausgangswert. Die Fruktose erreichte nach 60 Minuten einen Gleichgewichtsspiegel von ungefähr 35 mg/100 ml, was dem fünffachen Ausgangswert entsprach.

Die freien Fettsäuren fielen schnell und eindeutig bis 90 Minuten nach Infusionsbeginn auf ihren tiefsten Wert von 0,165 mval/L trotz anfänglichem Anstieg.

Überraschend war, daß die Konzentrationen von Glukose und Fruktose im arterio-venösen Kapilarblut höher waren, als die im venösen Blut. Zudem wurden die höher gemessenen Werte im Kapillarblut zeitlich schneller erreicht als vergleichsweise die im venösen Blut, was eine periphere Verwertung von Glukose und Fruktose anzeigt.

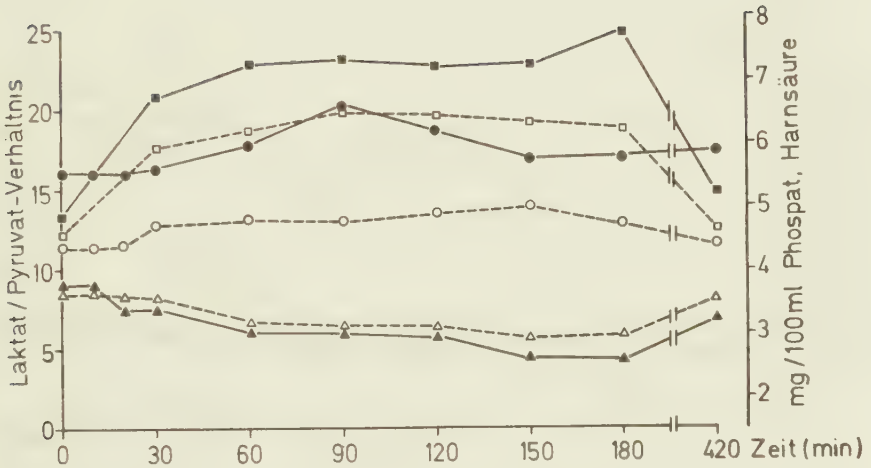
Bei Sorbit-Infusionen ($n = 6$; 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde) zeigten sich ähnliche metabolische Veränderungen wie unter den Fruktose-Infusionen: Die Glukosekonzentration stieg leicht und vorübergehend an, anstatt der Fruktose verfünffachte sich der Polyolwert auf 125 mg/100 ml, und die freien Fettsäuren fielen ebenfalls schnell und deutlich ab. Dies läßt sich erklären, da Sorbit wegen der hohen Aktivität der Sorbitdehydrogenase in der Leber unmittelbar dort in Fruktose umgebaut wird. Die periphere Verwertung von erhöhter Glukose- und Sorbitkonzentration im kapillären Mischblut verglichen zum venösen Blut konnte ebenfalls gezeigt werden.

Abbildung 1



Der Einfluß von Fruktose-Infusion ($n = 9$; $0,5 \text{ g/kg}$ Körpergewicht und Stunde) auf die Konzentration von Glukose (■—■), Fruktose (▲—▲) und freien Fettsäuren (○—○) im Blut. Zum Zeitpunkt 0 wurde die Fruktose-Infusion gestartet und über 3 Stunden fortgeführt.

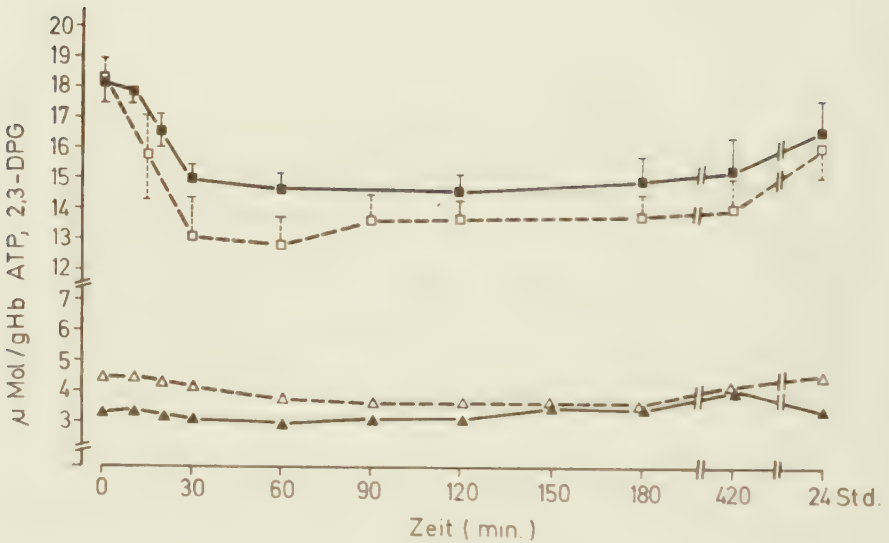
Abbildung 2



Der Einfluß von Fruktose- (n = 9; 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde) und Sorbit-Infusionen (n = 6; 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde) auf das Laktat/Pyruvat-Verhältnis (□—□, ■—■) im Blut und auf die Phosphat- (△—△, ▲—▲) und Harnsäure- (○—○, ●—●) Konzentration im Serum.

Die offenen Symbole (□, △, ○) zeigen die Werte nach Fruktose-Infusion, die geschlossenen Symbole (■, ▲, ●) die nach Sorbit-Infusion.

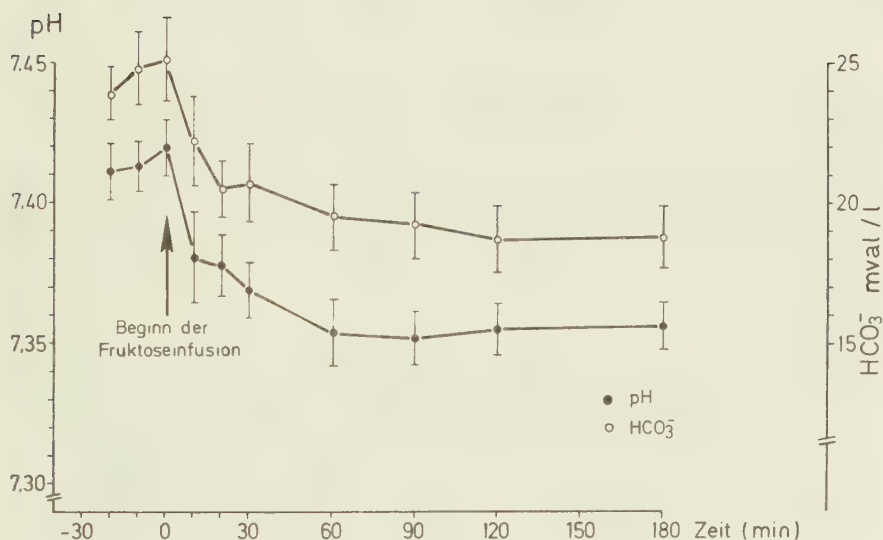
Abbildung 3



Der Einfluß von Fruktose- ($n = 9$; $0,5 \text{ g/kg}$ Körpergewicht und Stunde) und Sorbit-Infusionen ($n = 6$; $0,5 \text{ g/kg}$ Körpergewicht und Stunde) auf die erythrozytären 2,3-DPG ($\square-\square$, $\blacksquare-\blacksquare$) und ATP- ($\triangle-\triangle$, $\blacktriangle-\blacktriangle$) Konzentrationen. Für das 2,3-DPG ist die mittlere Standardabweichung angegeben.

Die offenen Symbole ($\square-\square$, $\triangle-\triangle$) zeigen die Werte nach Fruktose-Infusion, die geschlossenen Symbole ($\blacksquare-\blacksquare$, $\blacktriangle-\blacktriangle$) die nach Sorbit-Infusion.

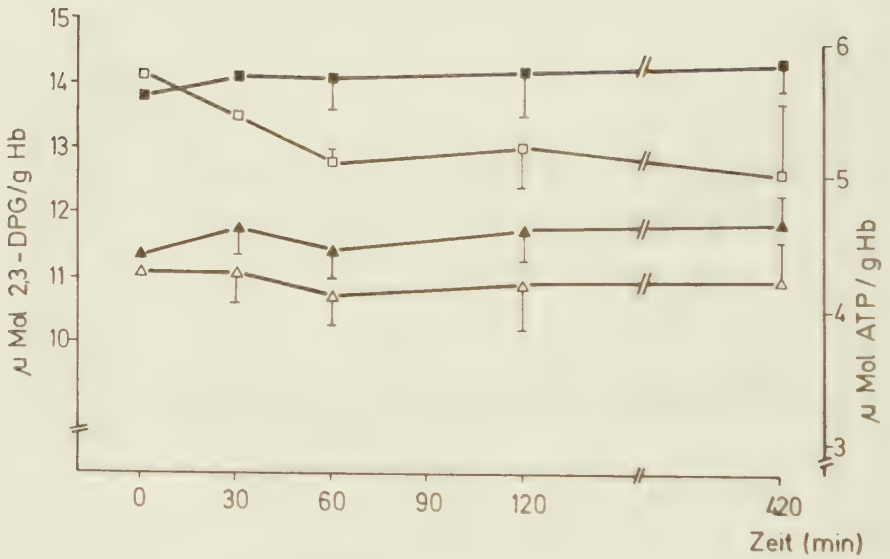
Abbildung 4



Das Verhalten von pH (●) und aktuellem Bikarbonat (○) im venösen Blut unter Fruktose-Infusionen ($n = 8$; 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde).

Zur Zeit 0 (Pfeil) wurde die Fruktose-Infusion gestartet. Die mittlere Standardabweichung ist angegeben.

Abbildung 5



Der in-vitro-Einfluß von anorganischem Phosphat auf die erythrozytären 2,3-DPG- ($\square$, $\blacksquare$) und ATP- ($\triangle$, $\blacktriangle$) Konzentrationen. Das Blut war 1 : 5 verdünnt mit einem isotonen Tris-Puffer pH 7,4 und bei 37°C inkubiert. Die offenen Symbole ($\square$ — $\square$, $\triangle$ — $\triangle$) zeigen die Versuche ohne Phosphat-Zugabe. Die geschlossenen Symbole ($\blacksquare$ — $\blacksquare$, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) zeigen parallele Versuche, bei denen 1 mM Phosphat/ml Inkubationsmenge zugegeben wurde. Die mittlere Standardabweichung für 4 Versuche ist angegeben.

Die Veränderungen des Laktat/Pyruvat-Quotienten, der Serum-Harnsäure und des anorganischen Phosphats nach Fruktose- und Sorbit-Infusionen sind aus Abbildung 2 ersichtlich. Unter beiden Bedingungen wurden wieder vergleichbare metabolische Veränderungen gefunden.

Das Laktat/Pyruvat-Verhältnis stieg rasch an; bei den Sorbit-Infusionen innerhalb 30 Minuten von 13,4 auf 20,8 und erreichte einen Höchstwert von 25. Die Werte unter den Fruktose-Infusionen lagen etwas niedriger.

Die Harnsäure im Serum stieg um rund 1 mg/100 ml.

Das anorganische Phosphat fiel schrittweise bis 150 Minuten nach Infusionsbeginn um annähernd 25 % seines Ausgangswertes ab (von 3,7 auf 2,6 mg/100 ml bei den Sorbit-Infusionen). Vier Stunden nach Ende der Infusionsdauer lagen die Werte wieder nahe ihrem Ausgangspunkt.

Abbildung 3 zeigt die Wirkung von intravenösen Fruktose- und Sorbit-Infusionen auf die erythrozytären 2,3-DPG- und ATP-Spiegel. Die Konzentration des 2,3-DPG fiel innerhalb von 30 Minuten nach Infusionsbeginn signifikant um etwa 25 % ab. Die p-Werte lagen dabei zwischen kleiner 0,01 und 0,001. Nach 24 Stunden - 21 Stunden nach Infusionsende - waren immer noch nicht die Ausgangswerte erreicht.

Im Gegensatz dazu zeigt die Graphik nur eine geringe Tendenz für einen ATP-Abfall im Erythrozyten. Statistisch gesehen kämen nur die Werte 90 Minuten nach Infusionsbeginn von Fruktose und 60 Minuten nach Infusionsbeginn von Sorbit nahe an eine Signifikanz, weil dort eine breite Streuung von Einzelwerten vorhanden war. Der Anstieg - teilweise im Überschuß - nach Beendigung der Infusion war signifikant mit einem p-Wert unter 0,025.

Bei 8 Fruktose-Infusionen (0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde) wurde gleichzeitig noch der venöse Blut-pH, das aktuelle Bikarbonat und der $p\text{CO}_2$ gemessen (Abbildung 4). Während der $p\text{CO}_2$

(nicht aufgeführt in der Graphik) unverändert blieb, war bereits innerhalb von 10 Minuten nach Beginn der Fruktose-Infusion der venöse Blut-pH signifikant ($p < 0,002$) von einem Ausgangswert von 7,42 auf 7,38 und nach 60 Minuten ($p < 0,001$) auf 7,36 abgesunken. Gleichzeitig verminderte sich das aktuelle Bikarbonat von 25 auf 19,5 mval/L nach 60 Minuten.

Ergebnisse der in-vitro-Versuche

Bei den intravenösen Infusionen mit Fruktose und Sorbit zeigte sich, daß während der Versuchsdauer nicht nur ein einziger Blutwert, sondern mehrere Blutparameter gleichzeitig verändert werden (siehe Ergebnisse der in-vivo-Versuche). Um nun gesondert die Wirkung einzelner Stoffwechselfparameter auf die 2,3-DPG- und ATP-Konzentration im menschlichen Erythrozyten prüfen zu können, führten wir parallel zu den in-vivo-Versuchen in-vitro-Versuche durch. Venöses Blut wurde 1 : 5 mit isotonem Tris-Puffer, pH 7,4, verdünnt und bei 37° C inkubiert. Alle Proben enthielten eine basale Glukose-Konzentration von 100 mg/100 ml (siehe Methodik). Kontrollwerte wurden von demselben Blut entnommen, das allein nur die basale Glukose-Konzentration enthielt.

Als erstes untersuchten wir den direkten Effekt der Kohlenhydrate Fruktose, Sorbit und Xylit auf die 2,3-DPG-Spiegel in den Erythrozyten. Dabei zeigte sich in Gegenwart von 50 und 200 mg/100 ml Fruktose und Sorbit und von 80 und 160 mg/100 ml Xylit während einer Inkubationsdauer von 3 Stunden keine Wirkung auf die erythrozytäre 2,3-DPG-Konzentration ($n = 3$ von jeder Gruppe). Auffallend waren nur die etwas niedrigen 2,3-DPG-Werte bei den Fruktose-Inkubationen (Tabelle 1), die ihre Ursache aus 2 Versuchen mit extrem niedrigen Werten fanden. Die Werte von den Sorbit- und Xylit-Inkubationen lagen gut im Normalbereich (Tabelle 2 und 3). So errechnete R. T. Card (18) aus einem Kollektiv von 24 erwachsenen Männern und 24 erwachsenen Frauen einen

Mittelwert von $13,84 \mu\text{M}$ 2,3-DPG/g Hb mit einer Standard-Abweichung von $\pm 1,51$, was gut mit anderen Autoren übereinstimmt. Die allgemein leichte Tendenz der 2,3-DPG-Spiegel, mit der Länge der Inkubationsdauer etwas abzunehmen, ist wohl auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen.

Tabelle 1

Erythrozytäre 2,3-DPG-Konzentrationen nach Inkubation mit Fruktose (n = 3)

Zeit	Kontrollwerte	Fruktose	Fruktose
		50 mg/100 ml	200 mg/100 ml
Start	$11,77 \pm 1,04$	$11,60 \pm 0,68$	$11,33 \pm 0,74$
15 Min.	$12,20 \pm 0,80$	$11,97 \pm 0,73$	$11,13 \pm 0,22$
30 Min.	$11,30 \pm 1,29$	$10,87 \pm 1,16$	$11,37 \pm 0,68$
60 Min.	$11,53 \pm 1,19$	$11,23 \pm 0,80$	$11,73 \pm 0,82$
120 Min.	$11,37 \pm 0,93$	$11,50 \pm 0,58$	$11,23 \pm 0,43$
180 Min.	$11,80 \pm 0,57$	$11,00 \pm 0,99$	$11,50 \pm 0,80$

Nach Vorinkubation von 30 Minuten mit 100 mg/100 ml Glukose wurden nach Zugabe von 50 mg/100 ml und 200 mg/100 ml Fruktose die 2,3-DPG-Konzentrationen im Erythrozyten gemessen. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte aus 3 Versuchen in μMol 2,3-DPG/gHb $\pm$ Standard-Abweichung.

Tabelle 2

Erythrozytäre 2,3-DPG-Konzentrationen nach Inkubation mit Sorbit
(n = 3)

Zeit	Kontrollwerte	Sorbit 50 mg/100 ml	Sorbit 200 mg/100
Start	13,82 $\pm$ 0,56	12,58 $\pm$ 0,37	13,46 $\pm$ 0,27
15 Min.	12,98 $\pm$ 0,21	12,30 $\pm$ 0,53	12,93 $\pm$ 0,29
30 Min.	12,99 $\pm$ 0,28	12,68 $\pm$ 0,15	13,11 $\pm$ 0,26
45 Min.	13,22 $\pm$ 0,36	12,40 $\pm$ 0,41	13,24 $\pm$ 0,51
60 Min.	13,06 $\pm$ 0,53	11,95 $\pm$ 0,49	12,47 $\pm$ 0,19
120 Min.	12,94 $\pm$ 0,23	12,32 $\pm$ 0,49	12,68 $\pm$ 0,17
180 Min.	12,62 $\pm$ 0,31	12,00 $\pm$ 0,68	12,25 $\pm$ 0,22

Nach Vorinkubation von 30 Minuten mit 100 mg/100 ml Glukose wurden nach Zugabe von 50 mg/100 ml und 200 mg/100 ml Sorbit die 2,3-DPG-Konzentrationen im Erythrozyten gemessen. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte aus 3 Versuchen in $\mu\text{Mol 2,3-DPG/gHb} \pm \text{Standard-Abweichung}$.

Tabelle 3

Erythrozytäre 2,3-DPG-Konzentrationen nach Inkubation mit Xylit
(n = 3)

<u>Zeit</u>	<u>Kontrollwerte</u>	<u>Xylit 80 mg/100 ml</u>	<u>Xylit 160 mg/100 ml</u>
Start	13,23 $\pm$ 0,33	12,98 $\pm$ 0,15	12,89 $\pm$ 0,10
15 Min.	13,67 $\pm$ 0,43	13,19 $\pm$ 0,19	13,44 $\pm$ 0,39
30 Min.	12,18 $\pm$ 0,31	12,69 $\pm$ 0,23	13,23 $\pm$ 0,09
45 Min.	12,16 $\pm$ 0,72	12,13 $\pm$ 0,44	12,85 $\pm$ 0,42
60 Min.	13,35 $\pm$ 0,86	11,79 $\pm$ 0,77	12,70 $\pm$ 0,46
120 Min.	12,25 $\pm$ 0,16	12,74 $\pm$ 0,35	12,36 $\pm$ 0,46
180 Min.	12,73 $\pm$ 0,26	12,39 $\pm$ 0,26	12,34 $\pm$ 0,35

Nach Vorinkubation von 30 Minuten mit 100 mg/100 ml Glukose wurden nach Zugabe von 80 mg/100 ml und 160 mg/100 ml Xylit die 2,3-DPG-Konzentrationen im Erythrozyten gemessen. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte aus 3 Versuchen in μMol 2,3-DPG/gHb $\pm$ Standard-Abweichung.

Tabelle 4

Erythrozytäre 2,3-DPG-Konzentrationen nach Inkubation mit Laktat/Pyruvat (n = 3)

Zeit	L/P = 10		L/P = 40		L/P = 10		L/P = 40	
	8 mg/100 ml	Laktat	32 mg/100 ml	Laktat	8 mg/100 ml	Laktat	32 mg/100 ml	Laktat
	0,8 mg/100 ml	Pyruvat	0,8 mg/100 ml	Pyruvat	8 mg/100 ml	Pyruvat	8 mg/100 ml	Pyruvat
Start	15,13 ±	1,09	14,41 ±	1,05	14,49 ±	0,83	15,03 ±	1,27
20 Min.	14,11 ±	0,99	13,98 ±	0,88	14,09 ±	1,00	14,07 ±	0,68
40 Min.	14,32 ±	0,89	13,70 ±	0,46	14,20 ±	1,26	13,82 ±	0,83
60 Min.	14,41 ±	0,92	14,41 ±	0,66	14,14 ±	1,15	12,92 ±	2,08
90 Min.	13,62 ±	1,50	14,24 ±	0,59	14,38 ±	0,67	14,61 ±	0,44
120 Min.	14,51 ±	0,95	13,62 ±	1,30	14,42 ±	0,83	13,76 ±	1,01

Nach einer Vorinkubation von 30 Minuten mit 100 mg/100 ml Glukose wurden nach Zugabe von einem Laktat/Pyruvat-Verhältnis von 10 (8 mg/100 ml Laktat und 0,8 mg/100 ml Pyruvat) und 40 (32 mg/100 ml Laktat und 0,8 mg/100 ml Pyruvat) - einmal ohne und einmal mit 80 mg/100 ml Fruktose - die 2,3- DPG-Konzentrationen im Erythrozyten gemessen. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte aus 3 Versuchen in $\mu\text{Mol } 2,3\text{-DPG/gHb} + \text{Standard-Abweichung}$.

Tabelle 5

Erythrozytäre ATP-Konzentrationen nach Inkubation mit Laktat/Pyruvat (n = 3)

Zeit	L/P = 10	L/P = 40	L/P = 10 + Fruktose 80 mg/100 ml	L/P = 40 + Fruktose 80 mg/100 ml
Start	3,73 ± 0,07	4,11 ± 0,06	3,54 ± 0,07	3,80 ± 0,40
20 Min.	4,11 ± 0,07	3,96 ± 0,22	3,59 ± 0,10	3,75 ± 0,10
40 Min.	3,93 ± 0,27	4,05 ± 0,14	3,59 ± 0,12	3,60 ± 0,30
60 Min.	4,06 ± 0,19	3,95 ± 0,16	3,70 ± 0,45	3,34 ± 0,86
90 Min.	4,08 ± 0,16	4,07 ± 0,28	3,70 ± 0,18	3,88 ± 0,32
120 Min.	4,01 ± 0,38	3,98 ± 0,61	3,93 ± 0,28	3,80 ± 0,43

Nach einer Vorinkubation von 30 Minuten mit 100 mg/100 ml Glukose wurden nach Zugabe von einem Laktat/Pyruvat-Verhältnis von 10 und 40 - einmal ohne und einmal mit 80 mg/100 ml Fruktose - die ATP-Konzentrationen im Erythrozyten gemessen. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte aus 3 Versuchen in $\mu\text{Mol ATP/gHb} \pm$ Standard-Abweichung.

Eine in-vitro-Erhöhung des Laktat/Pyruvat-Quotienten von 10 : 1 auf 40 : 1 bei konstantem pH (8 mg bzw. 32 mg Laktat und 0,8 mg Pyruvat pro 100 ml Inkubationsmedium) zeigte ebenfalls keine Veränderungen in der erythrozytären Konzentration von 2,3-DPG und ATP (Tabelle 4 und 5), und zwar sowohl ohne als auch in Gegenwart von 80 mg/100 ml Fruktose. Dabei ist zu bemerken, daß ein Anstieg des Laktat/Pyruvat-Verhältnisses auf 40 : 1 unter den in-vivo-Bedingungen nach Fruktose- und Sorbit-Infusionen bei weitem nicht erreicht wurde.

Ein leichter 2,3-DPG-Abfall zu Ende der Inkubationszeit ist auch hier wieder zu erkennen, wohingegen die ATP-Spiegel ziemlich konstant erscheinen.

Abbildung 5 zeigt die Wirkung des anorganischen Phosphats auf die 2,3-DPG- und ATP-Konzentration im Erythrozyten. Durch Verdünnen des Bluts mit isotonem Tris-Puffer von pH 7,4 im Verhältnis 1 : 5 wurde ein 80prozentiger Abfall der Phosphat-Ausgangs-Konzentration im Serum imitiert. Dabei nahm der Erythrozytengehalt an 2,3-DPG im Verlauf von 4 Stunden um 10 Prozent ab (von 14,3 auf 12,7 μMol 2,3-DPG/gHb), während die ATP-Spiegel gleich blieben ($n = 4$). Setzte man dagegen Phosphat in der physiologischen Konzentration von 1 mM dem Inkubationsmedium zu - man erreichte damit in etwa wieder die Phosphat-Ausgangs-Konzentration -, dann stiegen die Konzentrationen von 2,3-DPG geringfügig (13,8 auf 14,3 μMol 2,3-DPG/gHb), die von ATP etwas stärker an. Die Unterschiede nach 4 Stunden im Vergleich zur Versuchsreihe ohne Phosphat waren mit $p < 0,01$ bzw. $p < 0,02$ signifikant.

DISKUSSION

Stoffwechsel des Erythrozyten

Die Hauptaufgabe der unreifen roten Blutzelle ist es, Hämoglobin zu synthetisieren. Ihre Stoffwechselaktivität ist dabei ähnlich groß wie die von vielen anderen Gewebszellen. Ist die Reifung der Zelle kurz nach Eintritt in die Blutzirkulation abgeschlossen, so beschränkt sich die Funktion des Erythrozyten primär auf den Transport von Oxy-Hämoglobin und Carboxy-Hämoglobin (75). Während dieser Reifung im Blut vom Retikulozyten zum reifen Erythrozyten gehen der Zelle viele aktive Stoffwechsel- und Syntheseleistungen verloren. So erlischt mit Verlust der Zellorganellen (Mitochondrien) die oxydative Phosphorylierung, die Atmungsgröße nimmt auf 1 - 2 % ab (10, 17, 75). Die Glykolyse - fortan die alleinige Energiequelle der roten Zelle - beschränkt sich wegen vermindertem Glukoseverbrauch des Erythrozyten (5 % desjenigen atmender kernhaltiger Zellen) gleichzeitig auf 6 - 8 % (17). Der Pentosephosphatzzyklus macht im reifen Erythrozyten nur noch etwa 10 % des Glukoseumsatzes aus (zum Vergleich im Retikulozyten 80 %) (17, 75). Weiter verliert die Zelle die Möglichkeit zur Eiweiß- und Lipidsynthese (10, 76). Nur noch einfache Verbindungen können synthetisiert werden: z. B. Glutathion, Pyridin-nucleotide und, in Anwesenheit von Adenin, Adeninnucleotide (ATP) (10, 17, 76).

Die Aufgabe des reifen Erythrozyten - der Sauerstofftransport - fordert den Erhalt funktionstüchtiger Hämoglobin-Moleküle und die strukturelle Integrität der Zelle.

Die Erhaltung des Hämoglobins ist in großem Ausmaß von intrazellulären reduzierenden Mechanismen abhängig. NADH ist dabei der bevorzugte Wasserstoff-Donator in der enzymatischen Reduktion des Methämoglobins (17, 76). NADPH, das vornehmlich seinen Wasserstoff für die Reduktion oxydierter Glutathione (GSSG) hergibt, und das Glutathion (GSH), das für die Zellintegrität wichtige Thiolverbindungen (Enzyme, Membran, Globin) reduziert, spielen hierbei nur eine untergeordnete Rolle (17, 76).

Für die strukturelle Bewahrung der roten Blutzelle ist das ATP, als energiereiche Phosphatverbindung, von großer Bedeutung. So ist der aktive Ionentransport, mit dem der Elektrolyt-Gradient über die Zellmembran aufrechterhalten wird, vom ATP abhängig (17, 75). Weiter sind die Syntheseleistungen des Erythrozyten (Glutathionsynthese, Nucleotidbildung) ebenfalls vom ATP abhängig, und auch die Acylierung von Lysolecithin in der Membran geschieht mit Hilfe dieser energiereichen Substanz (17).

Nakao und Yoshikawa haben enge Zusammenhänge zwischen der Form der roten Zelle und ihrem ATP-Gehalt aufgezeigt und vermuten die Bedeutung des ATP für die Erhaltung der normalen discoidalen Form (85).

Der Erythrozyt bildet durch die Glykolyse als seine einzige Energiequelle ATP, wobei außerdem die für rote Blutzelle charakteristisch hohe 2,3- Diphosphoglyzeratspiegel ($2 - 3 \mu\text{Mol/ml}$ Zellen) synthetisiert werden, in einem zwar ubiquitären in anderen Zellen aber nur im geringsten Umfang ablaufenden Stoffwechselweg: dem 2,3-Diphosphoglyzeratzzyklus (Rapoport-Luebering-Zyklus) (64). 2,3-DPG macht in den Erythrozyten den Hauptanteil der energiereichen Phosphate aus; es übertrifft z. B. die Konzentration von ATP um das Fünffache. Seine Bedeutung und Regulation wird in einem eigenen Kapitel abgehandelt.

Da Glykogen in der roten Zelle nur in Spuren nachweisbar ist, bleibt die Zelle jederzeit auf die Verfügbarkeit von Glukose angewiesen.

Glukose dringt in den Erythrozyten durch erleichterte Diffusion ein, ein Vorgang, der im Gegensatz zu anderen Geweben z. B. Fettzellen, Muskelzellen nicht mit Hilfe von Insulin abläuft. In unterschiedlichem, durchweg aber geringerem Umfang können auch eine Reihe anderer Substrate zu Laktat abgebaut werden: vor allem Fruktose, auch Sorbit und Xylit (17).

Ebenfalls durch Diffusion dringt Phosphat in die Zelle ein, das

rasch in organische Diester eingebaut wird (32, 75). Gerlach konnte zeigen, daß Einstrom und Ausstrom von Phosphat durch die Erythrozytenmembran in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (32). So bestimmt die intrazelluläre Phosphatkonzentration die Größe des Phosphatausstroms, die extrazelluläre Phosphatkonzentration die Größe des Phosphateinstroms in die roten Blutzellen. Daher ist die Höhe der Phosphataufnahme abhängig von der Glykolyserate. Eine Senkung des pH bremst die Phosphatabgabe, so daß konsekutiv der intrazelluläre anorganische Phosphatspiegel ansteigt.

Nach Rose (68) hat die Glykolyse im erwachsenen Erythrozyten mindestens drei Funktionen:

- in der Glykolyse wird ATP produziert, das für den Ionen-Transport und die Verrichtung synthetischer Arbeit wichtig ist.
- Es werden hohe 2,3-DPG-Spiegel aufrechterhalten, denen für die Regulation des O_2 -Dissoziations-Gleichgewichts am Oxyhämoglobin eine Bedeutung zugeschrieben wird.
- Es werden reduzierende Äquivalente für die Aufrechterhaltung von Glutathion und Häm im reduzierten Zustand erzeugt.

Wie wird nun die Glykolyse reguliert? Da dem Erythrozyten die Fähigkeit zur Proteinsynthese verlorengegangen ist, bleiben regulative Prinzipien der Induktion und Repression von Enzymsynthesen ohne Bedeutung.

Eine Stoffwechselregulation auf Enzymniveau, in Form der Demaskierung, ist vorhanden (64). Klassische Fälle dafür sind Enzyme, welche ATP, Pyridin-Koenzyme und Eiweiße spalten. Auch eine mögliche Regulationsfähigkeit der Zellmembranen, die in Abhängigkeit vom Stoffwechsel veränderlich sind, ist nach Rapoport stets im Auge zu behalten (64). Busch (17) nennt für die Regelung der Umsatzgröße im reifen Erythrozyten vor allem zwei ineinandergreifende Faktoren:

- die Menge und katalytische Aktivität der Enzymproteine und
- die Umgebungsfaktoren dieser Enzymproteine, die den Umfang ihrer jeweiligen aktuellen katalytischen Aktivität in der Zelle quanti-

tativ regulieren.

Hierbei kommen kompetitive und allosterische Hemmungen sowie die Aktivierung von Enzymen durch Substrate, unmittelbare oder reaktionsferne Reaktionsprodukte und Kofaktoren zur Geltung. Daneben entscheiden noch pH- und Elektrolytverschiebungen im Medium.

Diese Wechselbeziehungen werden an der Hexokinase-Reaktion, dem ersten Enzym der Glykolyse-Kette deutlich. Wir finden eine direkte Abhängigkeit der Hexokinase von der Glukose-Konzentration, die wahrscheinlich fast immer im Sättigungsbereich liegt, sowie von Magnesium und ATP, deren Konzentration unterhalb der Sättigung, also im Regulationsbereich ist (64). Hemmend wirken nicht nur die unmittelbaren Produkte Glukose-6-Phosphat und ADP, sondern auch ATP und Magnesium, falls sie im Überschuß vorliegen, sowie das reaktionsferne 2,3-DPG. Betrachtet man ganze Reaktionsketten, so treten noch kompliziertere Verhältnisse auf. Dabei ist die Durchsatzgeschwindigkeit einer Kette durch die langsamste Teilreaktion beschränkt, die man Schrittmacherreaktion nennt (44, 64, 68).

Rapoport (64) vermutet in der Hexokinase-Reaktion den Schrittmacher für die Glykolyse. Folgende Gründe werden zur Begründung und Bekräftigung angeführt: Parallelität der Größe von Hexokinaseaktivität und Glykolyserate bei verschiedenen Tierarten, Übereinstimmung der Veränderung von Hexokinaseaktivität und Glykolyserate bei der in-vivo-Reifung von Retikulozyten, Ähnlichkeit der ausgeprägten pH-Abhängigkeit beider Größen, ihre gleichsinnige Magnesium-Abhängigkeit und die Tatsache, daß die Hexokinase unter allen Glykolyseenzymen im Erythrozyten die geringste Aktivität aufweist.

Nach Karlson (44) ist im Embden-Meyerhof-Abbau die Phosphorylierung des Fruktose-6-Phosphats durch die Phosphofruktokinase zum Fruktose-1,6-diphosphat die Schrittmacherreaktion. Diese Reaktion verbraucht ATP, die Phosphatübertragung ist praktisch nicht umkehrbar (44, 48), die Aktivität der Phosphofruktokinase wird vom ATP/ADP-System allosterisch kontrolliert. Da diese Reaktion stark exergonisch ist, ist sie weitgehend irreversibel, während die Schritte davor und danach reversibel sind und die Metabolit-

Konzentrationen dort nahezu den Gleichgewichtskonzentrationen entsprechen.

I. A. Rose (68) mißt auch der Phosphokinasereaktion als Schrittmacher die größere Bedeutung zu. Er sieht als limitierendes Agens für die Hexokinasereaktion vornehmlich das Produkt Glukose-6-Phosphat an. So kann man z. B. mit Methylen-Blau, das die Abnahme der Glukose-6-Phosphat-Konzentration begünstigt, den Glukoseverbrauch erhöhen. Auch zeigten Versuche, in denen der pH von 7 auf 7,4 erhöht wurde, eine Steigerung der Hexokinaseaktivität um das Doppelte, die aber ihre Ursache in der Konzentrationsabnahme von Glukose-6-Phosphat hatte. Da Glukose-6-Phosphat in der Hexosephosphatisomerasereaktion im Gleichgewicht mit Fruktose-6-Phosphat steht, das Substrat der Phosphofruktokinase ist, beruht also die Steigerung der Hexokinasereaktion auf einer möglichen Stimulation der Phosphofruktokinase-Aktivität.

Daß die vereinfachte Vorstellung einer Einpunktkontrolle nicht ausreicht, zeigt die Tatsache, daß unter den Bedingungen des Phosphatmangels das anorganische Phosphat und somit die Glyzerinaldehyd-Dehydrogenase (GAP-DH) begrenzend sein können (64). So kann auch hier ein Enzym mit großer Kapazität Ort einer Schrittmacherreaktion sein. Unter normalen Bedingungen liegt die GAP-DH im Regulationsbereich des Phosphoglyzerinaldehyds, des anorganischen Phosphats und auch des NAD/NADH-Systems. Fällt nun anorganisches Phosphat ab, so entsteht sekundär auch ein Abfall von ATP und 2,3-DPG, da die Diphosphoglyzeratkinase wegen des verminderten Substrats 1,3-Diphosphoglyzerat im Gleichgewicht gestört ist. Das Fließgleichgewicht der Glykolyse ist auf niedrigerem Niveau.

Auch das NAD/NADH-System kann begrenzend wirken. Versuche mit Fluoriden - das sind Substanzen die den Metabolismus sekundär durch Enolase-Hemmung verändern - haben dies gezeigt. Wenn die Enolase gehemmt ist, kann kein Pyruvat mehr gebildet und somit NAD nicht regeneriert werden. Da ATP in der Hexokinase und Phosphofruktokinase-Reaktion verbraucht wird, die GAP-DH aber durch das NAD-Defizit begrenzt ist, folgt ein ATP-Abfall, der mit mas-

sivem Kationen- und Wasserverlust in Gegenwart von Fluoriden begleitet ist (26). Mehrere Autoren messen dem NAD/NADH-Verhältnis eine zentrale Kontrollstelle der Glykolyse zu, da es die GAP-DH vor dem Schritt der ATP-Regeneration zusammen mit anorganischem Phosphat kontrolliert.

In-vitro-Versuche zeigten, daß dann der Glukoseverbrauch gestoppt wird, wenn die ATP-Konzentration für die Hexokinase-Reaktion zu niedrig wird (58).

Die Laktatdehydrogenase (LDH) als großes Enzym mit hoher Aktivität galt früher als verhältnismäßig problemlos und so wurde angenommen, daß das Laktat/Pyruvat-Verhältnis dem Regulations-Gleichgewicht entspricht. Da es aber sowohl eine NADH, wie NADPH abhängige LDH gibt, wies Ababei eine Querverbindung zwischen der letzten Reaktion der Glykolyse und dem Glutathionsystem auf. Außerdem existieren Flavinenzyme der löslichen Phase, welche die Koenzyme oxydieren, und weiter wird ein Austausch über die Erythrozytenmembran mit dem Plasma erwogen, so daß das erwartete Gleichgewicht von Laktat zu Pyruvat sich nicht einstellt (64).

Von Srivastava (74) wurde der Effekt normaler Bestandteile auf die Aktivitäten der Erythrozyten-Enzyme geprüft. Pyridoxal-5-Phosphat hemmt die Hexokinase, Phosphoglukomutase, Phosphoglukoseisomerase, Phosphofruktokinase, Aldolase, Pyruvatkinase und die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Auch Pyridoxal und Pyridoxin hemmen verschiedene glykolytische Enzyme, während Kreatin und Bikarbonat keinen Effekt zeigten.

Von einem pH-Effekt auf Enzyme wurde bereits berichtet. I. A. Rose (68) zeigte eine annähernd proportionale Beziehung zwischen der Geschwindigkeit des Glukoseverbrauchs und dem intrazellulären pH im Erythrozyten auf. Dabei wurde $\log v_{\text{Glc}}$ als eine Funktion des pH graphisch demonstriert. Eine weitere Steigerung der Glykolyse wurde unter anaeroben Bedingungen gefunden. Asakura (Lit. bei 68) deutet dies als einen alkalischen Bohreffekt, da Deoxyhämoglobin eine stärkere Base als Oxyhämoglobin ist. Eine intrazelluläre pH-Erhöhung, die auch experimentell ge-

messen wurde, stimuliert die Glykolyse. Rose (68) fand noch eine weitere Möglichkeit der Erklärung, indem er einen Anstieg von freien Magnesiumionen intrazellulär unter anaeroben Bedingungen feststellte. Ungebundenes Magnesium bildet in einem bestimmten Verhältnis zu ATP eine aktivierende Wirkung sowohl für die Hexokinase ($\text{ATP/Mg} = 1$) als auch für die Phosphofruktokinase ($\text{ATP/Mg} = 1/2$) und somit wohl auch auf die gesamte Glykolyse-Geschwindigkeit.

Daß der Stoffwechsel von Substraten und Koenzymen rückwirkend die Funktion und die Existenz von Enzymen beeinflussen kann, wird bei der Analyse des Glutathionsystems deutlich. Hier zeigt sich, daß die Aufrechterhaltung des GSH von der ungestörten Funktion von Enzymketten, die ständig das GSSG zu GSH reduzieren, abhängig ist. Auch hier wirken NADP- ebenso wie NAD-abhängige Systeme. Umgekehrt ist aber auch die Aktivität und die Existenz der beteiligten Enzyme sowie anderer, die essentielle SH-Gruppen tragen, von der Aufrechterhaltung des GSH, genauer gesagt, von der Beseitigung des GSSG, abhängig. Somit findet sich hier eine regulative Rückwirkung von den Substraten auf die Enzyme (64).

Wie wichtig das Vorhandensein genügend hoher Enzym-Spiegel für die Glykolyse und für den Fortbestand des Erythrozyten ist, zeigt W.N. Valentine (80) in seinem Rückblick auf die vielgestaltigen Ursachen einer hämolytischen Anämie. Eine erbliche hämolytische Anämie kann auf der Synthese eines abnormalen Hämoglobins, auf der Unfähigkeit, selbst die Globin-Ketten des Hämoglobins zu bilden, auf Membrandefekten und eben auch auf angeborene Mangelercheinungen im Enzymmuster des Erythrozyten basieren. So ist der angeborene Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase die häufigste Ursache der hämolytischen Anämie in bezug auf erbliche Enzymdefekte im Erythrozyten (80). Als Ursache für hämolytische Anämien konnte aber auch ein angeborener Mangel an Triosephosphat-Isomerase, Hexokinase, Glukose-Phosphat-Isomerase, Phosphoglyzerat-Kinase und Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase gefunden werden.

Die Rolle des Polyol-Weges innerhalb des Erythrozytenstoffwech-

sels untersuchten Travis und Morrison (79).

[15]



Sie fanden im menschlichen Erythrozyten Sorbit und freie Fruktose in Konzentrationen, die die im Plasma übersteigen. Bei der Inkubation von Erythrozyten mit ansteigenden Glukose-Konzentrationen, nehmen auch die intrazellulären Sorbit- und Fruktose-Spiegel zu. So wird bei einer Glukose-Konzentration von 5 mM 3 % der Glukose für die Synthese von Sorbit und Fruktose benutzt, bei einer Glukose-Konzentration von 50 mM werden es 11 %. Dies zeigt, daß der Polyol-Weg im Erythrozyten normal arbeitet und durch Glukoseerhöhung aktiviert werden kann, was die geringe Affinität von Glukose zur Aldosereduktase (die bis jetzt noch nicht isoliert werden konnte) bestätigt. Bei der hohen Glukose-Konzentration von 50 mM im Medium ist der Gesamtglukoseverbrauch und die Laktat-Produktion nicht sichtlich erhöht. Intrazellulär sind Laktat/Pyruvat-Quotient und die $^{14}\text{CC}_2$ -Produktion aus $^{14}\text{C}_1$ -Glukose angestiegen. Diese Veränderungen spiegeln sich im Redox-System NADH, NADPH bei gesteigertem Polyolweg wider, zumal Zugabe von Pyruvat diese Veränderungen verhütet. Auch Zugabe von Na-Barbital, was die Sorbit-Synthese hemmt, stoppt die oben beschriebenen metabolischen Veränderungen.

Asakura berichtet von Xylit-Versuchen - Xylit ist Substrat der Sorbitol-Dehydrogenase - ebenfalls einen Anstieg im Laktat/Pyruvat-Verhältnis (Lit. bei 79).

Bei hyperglykämischen Diabetikern wird auch eine erhöhte Sorbit-Konzentration im Erythrozyten gefunden, was womöglich die Konsequenz eines erhöhten Polyol-Weges darstellt (Lit. bei 79). Der Polyol-Weg im Erythrozyten ist existent, seine Funktion innerhalb des Stoffwechsels bis jetzt noch unbekannt.

Die Bedeutung des 2,3-DPG

Beim anaeroben Abbau der Kohlenhydrate durch die Glykolyse wird im Reaktionsschritt nach der Substratkettenphosphorylierung das Produkt 3-Phosphoglyzerinsäure (3-PG) durch die Phosphoglyzerat-Mutase in die 2-Phosphoglyzerinsäure (2-PG) umgelagert (44); dabei beeinflußt 2,3-DPG als "Koenzym" die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion. Das 3-Phosphoglyzerat wird vom Enzym-Diphosphat-Komplex phosphoryliert und das dephosphorylierte Koenzym = 2-Phosphoglyzerinsäure abdissoziiert, während das Phosphorylierungsprodukt als neues Koenzym wirkt.

Da bei dieser Reaktion nur geringe Mengen 2,3-DPG erforderlich sind, war es bis vor kurzem noch unklar, warum das 2,3-DPG im reifen Erythrozyten - im Gegensatz zu anderen Zellen - über die Hälfte der organischen Phosphate ($2 - 3 \mu\text{M/ml}$ Zellen) ausmachen sollte. Erst 1967 fanden unabhängig voneinander Benesch und Benesch (6), und Chanutin und Curnish (19), daß ein Zusammenhang zwischen der 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten und der Hämoglobin-Sauerstoffbindungskurve besteht. 2,3-DPG erniedrigt die Affinität des Hb für O_2 , indem es die Struktur der deoxygenierten Form begünstigt. Eine höhere 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten bewirkt eine Rechtsverschiebung der Hb- O_2 -Bindungskurve. Das heißt, bei gleichem Sauerstoff-Partialdruck dissoziiert mehr O_2 vom Hb ab, woraus eine bessere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff resultiert.

Das 2,3-DPG wird bevorzugt vom reduzierten Hämoglobin gebunden (3, 7, 8, 65, 66, 84). Der freie Platz zwischen den β -Ketten des Hb-Moleküls, der sich mit dem Zustand der Oxygenierung ändert, reguliert die Bindungsaffinität zum 2,3-DPG (3). Nach den kristallographischen Röntgenuntersuchungen von Perutz und Arnone (1, 60) bilden die fünf Anionen-Gruppen des 2,3-DPG Salzbrücken mit positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der sogenannten "zentralen Höhle" zwischen den zwei β -Ketten des Deoxyhämoglobin-Tetramers. Mit der Zunahme der Oxygenierung des Hämoglobins verändern sich die sterischen Verhältnisse so, daß eine Bindung für

das 2,3-DPG-Molekül mit den endständigen Aminogruppen nicht mehr möglich ist. Garby (31) fand, daß die Bindung des 2,3-DPG-Moleküls an das Hämoglobin erleichtert ist, wenn das zweite, dritte und vierte Sauerstoff-Molekül vom Hämoglobin-Molekül abdissoziiert ist. Die Reaktion von O_2 und 2,3-DPG mit Hämoglobin ist kompetitiv, obgleich beide Moleküle verschiedene Plätze am Hb-Molekül besetzen (7).

An ein paar Beispielen sei die Bedeutung des 2,3-DPG für die O_2 -Affinität ans Hb demonstriert. Ein Maß für die Sauerstoff-Affinität ist der p_{50} -Wert, der Sauerstoffdruck, bei dem die Hälfte der Hämoglobin-Moleküle in oxygenierter Form vorliegen.

Bei einem Kollektiv von 39 Patienten mit funktioneller Herzschwäche (nicht zyanotische Herzkrankte) fand Woodson (34) einen progressiven Abfall in der Hämoglobin-Sauerstoff-Affinität bei Verschlechterung der Herzfunktion: die ansteigenden p_{50} -Werte der O_2 -Dissoziationskurve standen in einer deutlich direkten Beziehung zu den angestiegenen 2,3-DPG-Konzentrationen im Erythrozyten.

Wurden Normalpersonen in einer Höhe von 4500 m einer Hypoxie ausgesetzt, so entwickelten sie innerhalb von 6 Stunden eine respiratorische Alkalose mit deutlichem Anstieg der O_2 -Affinität ans Hämoglobin (56). Anhaltende Alkalose und Hypokapnie wurde aber mit einem deutlichen 2,3-DPG-Anstieg in den Erythrozyten und einem damit verbundenen Abfall der O_2 -Affinität beantwortet.

2,3-DPG-Untersuchungen bei verschiedenen Anämien ergaben folgende Beziehung: Pro Gramm Hämoglobin-Abfall stieg das 2,3-DPG um 0,23 mM/L und der p_{50} um 0,3 mmHg an. Torrance (78) vermutet, daß die Hälfte des O_2 -Defizits bei einer Anämie so durch einen 2,3-DPG-Anstieg kompensiert werden kann.

Neben dem 2,3-DPG und den übrigen bekannten Parametern wie pH, Temperatur u. a., die die Sauerstoffbindungskurve beeinflussen, müssen noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen, da Astrup (4) bei einigen Patienten bemerkte, wie der hohe Korrelations-

grad zwischen 2,3-DPG und p_{50} verloren ging.

1953 fanden Valtis und Kennedy (Lit. bei 59) bei in ACD-Lösungen aufbewahrttem Blut eine erhöhte O_2 -Affinität. Als Ursache stellte sich später ein rascher 2,3-DPG-Abfall heraus, binnen 2 Wochen 80 %.

Alte Erythrozyten zeigen eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve. Auch hier ist die Ursache ein erythrozytärer 2,3-DPG-Abfall (3).

Vermutlich liegt wohl die Hauptfunktion des 2,3-DPG in der roten Zelle in seiner Regulatorfähigkeit, wie gut oder schlecht der Sauerstoff vom Hämoglobin abdissoziiert. Andere Funktionen sollen deshalb nicht unerwähnt bleiben.

2,3-DPG kann auch als Speicherform des energiereichen Phosphats in der roten Zelle betrachtet werden, vergleichbar dem Kreatinphosphat in der Muskelzelle (17). Bei seinem Abbau wird in der Pyruvatkinasereaktion ATP gebildet. Werden menschliche Erythrozyten in ein Medium mit 50 mM Glukose inkubiert, so fällt das 2,3-DPG ab, der Laktat/Pyruvat-Quotient steigt an und die ATP-Spiegel bleiben konstant (79). Eine größere Beteiligung des Polyol-Weges am Glukoseabbau bringt Veränderungen im Redox-Status (NADH und NADPH werden vermehrt gebildet) und 2,3-DPG fällt für ATP und Laktat ab. Ähnliches zeigt sich bei Versuchen unter Glukoseentzug (25). Nach einer Stunde war der Triosepool erschöpft. Der Abbau des 2,3-DPG zu Pyruvat und Laktat war dann die alleinige Quelle für die ATP-Synthese.

In der Gesamtbilanz geht dem Erythrozyten beim Abbau der Glukose über das 2,3-DPG im Verhältnis zum direkten Triosephosphatabbau Energie verloren. Aus 2,3-DPG wird Phosphat als anorganisches Phosphat unter Verlust seiner Bindungsenergie freigesetzt. Bei Beschreitung des 2,3-DPG-Weges ergibt sich also eine hinsichtlich des Energiegewinns "ineffektive Glykolyse". Dafür wird aber die NADH-Bildung vom ATP-Verbrauch unabhängig - ein Mechanismus, der den besonderen Bedingungen des Erythrozyten mit

seinem geringen Energieverbrauch, aber je nach Umfang der erforderlichen Hämoglobinreduktion wechselnden Bedarf an NADH entspräche (17).

Da im Erythrozyten eine hohe AMP-Deaminase-Aktivität herrscht und die rote Zelle selbst aber unfähig ist, einen Purinring zu synthetisieren, wie IMP in AMP umzuwandeln, ist der Kontrollmechanismus der AMP-Deaminase für die Adenin-Nucleotid-Konzentration im Erythrozyten wichtig. Askari und Rao (2) fanden in 2,3-DPG einen Hemmer dieses Enzyms und ihre Werte lassen vermuten, daß das 2,3-DPG über einen allosterischen Effekt auf die AMP-Deaminase eine mögliche Kontrollfunktion auf die Adenin-Nukleotid-Konzentration des intakten Erythrozyten ausübt. Ein Beweis dafür ist, daß bei Blutkonserven ein Adenin-Nukleotid-Abfall immer mit einem schnelleren 2,3-DPG-Verschwinden einhergeht (3, 17, 59).

Die Bedeutung des 2,3-DPG im reifen Erythrozyten kann wie folgt zusammengefaßt werden:

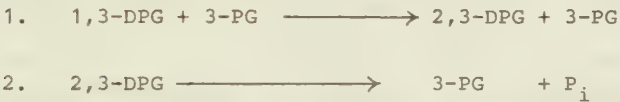
- Rolle als "Koenzym" bei der enzymatischen Umwandlung von 3-PG zu 2-PG
- Freisetzung von anorganischem Phosphat
- Regulatorische Eigenschaften in Glykolyse und Pentose-Phosphat-Shunt aufgrund beobachteter Hemmwirkung für Transketolase, Transaldolase und mehrere Transphosphorylasen in der Glykolyse (näheres siehe Regulation des 2,3-DPG. Lit. bei 2)
- Regulator der O_2 -Affinität an das Hämoglobin: 2,3-DPG bevorzugt die deoxygenierte Form des Hb und reagiert kompetitiv mit dem Sauerstoff
- Speicherform des energiereichen Phosphats ATP ("ineffektive Glykolyse")
- Über das 2,3-DPG getrennte Möglichkeit der NADH- und ATP-Bildung

- Kontrollfunktion der AMP-Deaminase
(regelt den Verlust der Adeninnukleotide).

Regulation von 2,3-DPG

Das 2,3-Diphosphoglyzerat wird in einem für die rote Zelle charakteristischen Stoffwechselweg: dem 2,3-Diphosphoglyzeratzyklus (Rapoport-Luebering-Zyklus) synthetisiert (17, 64, 68, 69).

[16]



2,3-Diphosphoglyzerat-Mutase (1) katalysiert die Bildung von 2,3-DPG aus 1,3-DPG und 2,3-Diphosphoglyzeratphosphatase (2) katalysiert seine Spaltung zu 3-PG. Damit wird der direkte Weg der Glykolyse von 1,3-DPG zu 3-PG - durch die Phosphoglyzerat-Kinase katalysiert - umgangen und die "Substratkettenphosphorylierung" geht dadurch verloren.

Im HämolySAT hat Rapoport (64), der als erster die beteiligten Enzyme nachgewiesen hat, folgende Enzym-Kapazitäten gemessen: die Phosphoglyzerat-Kinase (PGK) ist dreimal so aktiv wie die Mutase, die wiederum fast eine Größenordnung aktiver als die Phosphatase. Die geringfügige Aktivität der Phosphatase ist vermutlich auf die hohe Affinität des Enzyms zum Hemmungsprodukt 3-PG zurückzuführen, was viele Autoren dazu bewog, dieses Enzym als Schrittmacherenzym des 2,3-DPG-Zyklus anzusehen (17, 64).

Da 3-PG die Bildung von 2,3-DPG beschleunigt, aber dessen Spaltung zu 3-PG hemmt, nimmt Busch (17) einen "autoregulativen" Charakter des Zyklus an: der 3-PG-Pegel steuert den Pegel von

2,3-DPG. 2,3-DPG wiederum hemmt die 2,3-DPG-Mutase.

I.A. Rose (68) mißt der Pyruvat-Kinase-Reaktion für die Kontrolle des 2,3-DPG eine entscheidende Rolle bei. Die Aktivität der Pyruvat-Kinase (PK) ist für das Aufrechterhalten der Gleichgewichtskonzentration von 1,3-DPG und damit auch von 2,3-DPG sehr wichtig. Die einzelnen Reaktionsschritte zwischen Fruktosediphosphat und Phosphoenolpyruvat befinden sich in einem quasi-Gleichgewicht. Bei gesteigerter Glykolyse erhöht sich der 1,3-DPG-Spiegel, wobei GAP-DH und PG-Kinase im Gleichgewicht bleiben. 1,3-DPG fließt zu 2,3-DPG über, da 2,3-DPG von niedrigeren 1,3-DPG-Konzentrationen abhängig ist. Kinetik-Studien der 2,3-DPG-Mutase zeigten, daß die 2,3-DPG-Synthese von niedrigen 1,3-DPG-Spiegeln (Substrat) begrenzt und durch 2,3-DPG (Produkt-Hemmung) gehemmt wird (69). 2,3-DPG wird solange gebildet, bis 1,3-DPG wieder im Gleichgewicht mit der PG-Kinase-Reaktion ist.

Die 2,3-DPG-Konzentration ist proportional dem ATP/ADP-Verhältnis und umgekehrt proportional der PK-Aktivität. Letzteres erklärt hohe 2,3-DPG-Spiegel bei erblichem PK-Mangel im Erythrozyten (68,80).

2,3-DPG-Synthese erhöht das NADH/NAD-Verhältnis. Solange hohe Werte von $(\text{ATP}/\text{ADP}) \times \text{PEP}$, trotz ATP-Verlust durch die 2,3-DPG-Synthese, aufrechterhalten werden, wird 2,3-DPG synthetisiert. Die NADH-Oxydation ist eine Voraussetzung für die hohen 2,3-DPG-Spiegel, da NADH den Glykolysefluß an der GAP-DH-Reaktion blockieren könnte (68). (Obgleich noch keine oxydierenden Substanzen bestimmt werden konnten, scheint dies für den Erythrozyten als zirkulierende Zelle nicht schwierig zu sein, da er über das Laktat/Pyruvat mit dem Plasma, das durch aerobe Zellen abgepuffert wird, in Verbindung steht und selbst über das Enzym LDH verfügt (17, 64, 68]).

Im in-vitro-System beschleunigen ADP und NADH die Spaltung von 2,3-DPG. ADP hemmt die DPG-Mutase durch Absinken des Glyzerinsäurespiegels über die Aktivierung der PK-Reaktion. Zudem aktiviert ADP (in höheren Konzentrationen) noch die PG-Kinase-Reak-

tion und drosselt somit auf doppelte Weise den 2,3-DPG-Zyklus. NADH wirkt über die reduktive Entfernung des Pyruvats und über die oben beschriebene Blockade der Glykolyse an der GAP-DH. ATP dagegen inaktiviert die PG-Kinase-Reaktion (Produkthemmung). Somit gewinnt auch die ATP/ADP-Relation Einfluß auf die Steuerung des 2,3-DPG-Zyklus (17, 64, 68).

Rapoport (64) stellte bei seinen Untersuchungen an Hämolysaten, an denen systematisch die Konzentration der Reaktionspartner variiert wurde, fest, daß bei physiologischen Konzentrationen von ADP die 2,3-DPG-Bildung überwiegt.

Welchen quantitativen Anteil der 2,3-DPG-Zyklus an der Glykolyse hat, ist immer noch nicht ganz geklärt. Marmier (51) zeigte durch Untersuchungen mit O^{18} die vorrangige Bedeutung des 2,3-DPG-Weges auf. Hamosaki (35) berechnete aufgrund des Anstiegs und Abfalls der 2,3-DPG-Konzentration unter bestimmten Bedingungen einen 20 - 50 % Anteil an der erythrozytären Glykolyse-rate. Roigas (67) gibt einen milieuhabhängig wechselnden Anteil des 2,3-DPG-Zyklus am Glukoseabbau zwischen 20 und 70 %, Rapoport (64) bis zu 80 % an (Kaninchenerythrozyt).

Aerobe und anaerobe Unterschiede in der 2,3-DPG-Konzentration werden zweifach gedeutet. I.A. Rose (68) sagt, daß 2,3-DPG vermehrt von reduziertem Hb gebunden wird und sich dabei aus seiner Magnesiumbindung befreit. Vermindertes freies 2,3-DPG und erhöhtes freies Mg^{++} erhöhen die 2,3-DPG-Synthese. Rörth (65) nimmt bei anaeroben Verhältnissen eine intraerythrozytäre pH-Erhöhung von mindestens 0,05 Einheiten an und berechnet daraus bei pH 7,4 eine 2,3-DPG-Konzentrationsänderung von 0,15 Mol/Mol Hb.

Hier wird schon angedeutet, daß der pH-Wert einen entscheidenden Einfluß auf die 2,3-DPG-Spiegel hat (4, 5, 22, 65, 84). So zieht ein Abfall des pH-Wertes einen 2,3-DPG-Konzentrationsabfall nach sich, bei alkalischer Stoffwechsellaage ist mit einer Zunahme des 2,3-DPG zu rechnen.

Nach Berechnungen von Rörth (65) ruft eine Änderung des intraerythrozytären pH-Wertes um 0,01 (im Bereich von 7,10 - 7,30) eine 2,3-DPG-Konzentrationsänderung von 0,04 Mol/Mol Hb hervor. Dabei wird betont, daß eine pH-bedingte 2,3-DPG-Veränderung und die damit verbundene Verschiebung der O_2 -Bindungskurve dem Bohr-Effekt entgegenwirkt, auch quantitativ, was zu einer nahezu konstanten O_2 -Affinität zu Hb auch bei niedrigen pH-Werten führt.

Isolierte Untersuchungen der 2,3-DPG-Mutase zeigten eine deutliche pH-Abhängigkeit des Enzyms (69). Ein pH-Anstieg von 6,75 auf 7,75 bringt einen 4fachen Anstieg der effektiven enzymatischen Rate, wobei auch bei ansteigendem pH die Hemmwirkung von 2,3-DPG auf die Mutase nachließ. Die gefundenen pH-bedingten 2,3-DPG-Veränderungen sind gut vereinbar mit der pH-Wirkung auf die 2,3-DPG-Mutase.

Durch Inkubation menschlicher Erythrozyten mit Inosin, Pyruvat und anorganischen Phosphaten kann die 2,3-DPG-Konzentration auf das Fünffache, nämlich bis zu 24 μ Mol/g Erythrozyten angehoben werden (22). Mit dem Anwachsen der nicht membrandurchlässigen Anionen wird das Donnan-Gleichgewicht verschoben, was ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes zur Folge hat. Dieser Mechanismus limitiert das weitere Ansteigen der 2,3-DPG-Konzentration.

So stellte Bellingham (5) bei seinen Untersuchungen über die adaptive Wirkung von 2,3-DPG auf die O_2 -Bindungskurve bei Azidose und Alkalose eine lineare Beziehung fest zwischen der pH-Differenz Plasma/Zelle und der intraerythrozytären 2,3-DPG-Konzentration. Aus dieser Beziehung führt er 35 % der 2,3-DPG-Wirkung auf die Sauerstoffbindungskurve auf den eigenen intraerythrozytären pH-Effekt des 2,3-DPG zurück.

Der nun in mehreren Beispielen aufgezeigte pH-Effekt auf die erythrozytären 2,3-DPG-Spiegel steht sicher nebst seiner direkten Wirkung auf die 2,3-DPG-Mutase auch in Zusammenhang mit seinem Einfluß auf die Enzymaktivitäten der Glykolyse (17, 68). Es ist vielfach beschrieben worden, daß eine Stimulation der Glyko-

lyse mit einem 2,3-DPG-Anstieg einhergeht (3, 78). Die Glykolyse wird zum Beispiel auch durch die Deoxygenierung des Hämoglobin-Moleküls angeregt, was ja, wie oben beschrieben, die 2,3-DPG-Konzentration ebenfalls ansteigen läßt. Auch die Zugabe von Inosin zu gespeichertem Blut stimuliert die Glykolyse und ruft eine 2,3-DPG-Erhöhung hervor (3, 12).

Weiter wird auch von Jahrmärker (42) von einem positiven Effekt des anorganischen Phosphats auf die Glykolyserate berichtet. In-vitro- und in-vivo-Versuche bestätigten bei einem geringen Anstieg von anorganischem Phosphat erhöhte 2,3-DPG-Konzentrationen im Erythrozyten (4, 18, 22, 49). Kinder haben durchschnittlich einen 50 % höheren Phosphatspiegel als Erwachsene (18). Eine vergleichende Studie mit 62 Kindern im Alter zwischen 1 und 12 Jahren und 48 Erwachsenen machte einen 7 %ig erhöhten 2,3-DPG-Spiegel in den kindlichen Erythrozyten deutlich (das erklärt die physiologische Anämie der Kinder). Untersuchungen an urämischen Patienten mit erhöhtem Serum-Phosphat zeigten ebenfalls gute Beziehungen zu erhöhtem 2,3-DPG-Spiegel in der roten Blutzelle (49). Ein möglich direkter Effekt des anorganischen Phosphats auf die 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten - hauptsächlich über gesteigerte Glykolyserate - konnte durch parallele in-vitro-Versuche bestätigt werden (49). Fügte man normalem Blut Phosphat zu oder inkubierte man normale Erythrozyten in urämisches Plasma mit erhöhtem Phosphatspiegel, so wurde beidemal ein 2,3-DPG-Spiegel erreicht, der auch in Erythrozyten von urämischen Patienten gefunden werden konnte (sinnvolle Kompensation der Anämie). Andererseits wurden bei Patienten mit erniedrigtem Serum-Phosphat stark erniedrigte 2,3-DPG-Werte beobachtet. Vermindertes anorganisches Phosphat, das Kofaktor für die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ist, bringt die intraerythrozytäre Glykolyse auf niedrigeres Niveau; die 2,3-DPG-Spiegel nehmen ab.

Bei dem oben schon erwähnten Inkubationsmedium von Inosin, Pyruvat und anorganischem Phosphat zu 5facher Anreicherung von 2,3-DPG konnte ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen dem extrazellulären Phosphatspiegel und der 2,3-DPG-Menge gefunden werden (22). Zudem waren noch das 3-PG, als Koenzym der 2,3-DPG-

Mutase, und PEP, als Substrat der PK, die umgekehrt proportional der 2,3-DPG-Konzentration ist, signifikant erhöht. Ein zum extrazellulären Phosphat-Anstieg verhältnismäßig geringer Phosphat-Anstieg intrazellulär bestärkt die Annahme des sofortigen Einbaues in organische Phosphat-Verbindungen (32, 76), die ebenfalls stark angestiegen waren.

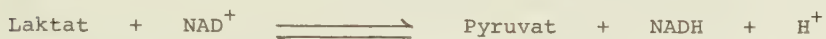
Daß das 2,3-DPG sich auch selbst in einem gewissen Maß regulieren kann, zeigen Arbeiten von Beutler (11, 74), der den Einfluß von physiologischen 2,3-DPG-Konzentrationen auf die Aktivität aller glykolytischen Enzyme des Erythrozyten untersucht hat. Das 2,3-DPG hemmt zu 75 % die Phosphofruktokinase kompetitiv mit Fruktose-6-phosphat, die Aldolase kompetitiv mit Fruktose-1-6-diphosphat, die Phosphogluko-Mutase kompetitiv mit Glukose-1-6-diphosphat, zu 50 % die Hexokinase kompetitiv mit ATP und zu 25 % die Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase nicht kompetitiv. Mit Ausnahme von Phosphoglukose-Isomerase und Triosephosphat-Isomerase, den zwei aktivsten Enzymen, werden alle Enzyme, die für die Umwandlung von Glukose zu 2,3-DPG erforderlich, von 2,3-DPG gehemmt. Dies kann gut die Grundlage für einen möglichen, physiologisch wichtigen Mechanismus für die Regulation der 2,3-DPG-Spiegel innerhalb der erythrozytären Glykolyse bilden (im erweiterten Sinne wieder autoregulativ). In der Tat konnten Deuticke und Duhm (22), während sie künstlich die 2,3-DPG-Spiegel erhöhten, einen deutlichen Abfall in der Rate des Glukose-Verbrauchs feststellen.

Wie wichtig einerseits ein hoher pH-Wert und andererseits genügend hohe NAD^+ -Spiegel für das Aufrechterhalten genügend hoher 2,3-DPG-Spiegel ist, zeigt sich bei der Konservierung von Frischblut (59).

Früher, darauf bedacht allein die ATP-Spiegel möglichst hoch zu halten, um eine gute Lebensfähigkeit des Erythrozyten zu gewährleisten, inkubierte man bei pH 5,5 unter Zugabe von Adenin (12, 17). Dabei waren die 2,3-DPG-Spiegel stark abgesunken - 80 % innerhalb von 2 Wochen - und die Sauerstoffversorgung nach Reinfusion war mangelhaft, zumal die Regenerationsfähigkeit des

2,3-DPG sehr träge ist (in 8 Stunden 1/3 des bei der Konservierung erlittenen Verlustes) (12, 59). Hoher pH erhöht die 2,3-DPG-Spiegel (über 2,3-DPG-Mutase + Glykolyse), erniedrigt aber die ATP-Spiegel, da durch den pH-Anstieg das Gleichgewicht der LDH-Reaktion nach rechts verschoben wird:

[17]



Auf Kosten von NAD^+ wird also vermehrt $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet, was die GAP-DH blockiert, und ATP geht verloren. Paniker und Beutler (59) fanden in der Zugabe von Pyruvat einen Kompromiß. Pyruvat verlagert auch bei höherem pH das Gleichgewicht durch Masseneffekt auf die linke Seite. So wurden in einer CPD-Adenin-Lösung (pH 7,5) nach 3 Wochen Lagerung mit Pyruvat vom Ausgangswert noch 85 % 2,3-DPG gefunden, im Vergleich zu 25 - 35 % ohne Pyruvat.

Der Stoffwechsel unter dem Einfluß von Fruktose, Sorbit und Xylit

Kohlenhydrate, insbesondere Glukose, sind im Rahmen einer parenteralen Ernährung als Kalorienträger von entscheidender Bedeutung. Ist die Glukoseverwertung infolge eines absoluten oder relativen Insulinmangels (z. B. bei der diabetischen Stoffwechselstörung) herabgesetzt, hat sich die Anwendung anderer, unter bestimmten Bedingungen insulinunabhängig verwerteter Kohlenhydrate als vorteilhaft erwiesen (52). Unter dem Sammelbegriff der Zuckeraustauschstoffe sind die wichtigsten Vertreter Fruktose, Sorbit und Xylit. Fruktoseinfusionen sind besonders bei Diabetes mellitus und Lebererkrankungen wegen einiger theoretischer Vorteile gegenüber der Glukose empfohlen worden (21, 55, 73). So wird Fruktose in der Leber schneller metabolisiert, sie ist in ih-

rer Verwertung vom Insulin partiell unabhängig, besitzt eine antiketogene Wirkung und verursacht geringere Schäden an den Venen (82). Doch in den letzten Jahren wurde auch über Nebenwirkungen der parenteralen Verwendung von Zuckeraustauschstoffen berichtet: Anstieg der Laktatkonzentration im Blut (9, 16, 28, 29, 36, 37, 53), vorübergehende Hyperurikämie (28, 29, 37, 43, 53, 72) und Abfall der Adenosinphosphate in der Leber (14, 15, 50, 62, 83). Verschiedene Autoren haben deshalb besonders im Fall einer gestörten Laktatverwertung (Schock, Leberschaden oder entgleister Diabetes) vor einer kritiklosen Anwendung - speziell der Fruktose - gewarnt (82).

Fruktose, Sorbit und Xylit werden mit Hilfe bestimmter Enzyme in den Stoffwechsel eingeschleust (Lit. bei 52). Dabei erfolgt ihre Verwertung zu mehr als 80 % allein in der Leber (27). Sorbit wird in der Leber nur zu einem kleinen Teil direkt in Glukose umgewandelt. Der weitaus größere Anteil des Sorbits wird in der Leber von der reichlich vorkommenden Sorbitdehydrogenase in einem NAD-abhängigen Stoffwechselschritt zu Fruktose dehydriert. Der weitere Abbaueweg ist dann mit dem der Fruktose identisch (13).

Fruktose wird von der Fruktokinase zu Fruktose-1-Phosphat phosphoryliert. Die 1-Phosphofruktaldolase spaltet in einem weiteren Schritt das entstandene Fruktose-1-Phosphat in Dihydroxyazeton-Phosphat und Glyzerinaldehyd. Dem Glyzerinaldehyd stehen zum weiteren Abbau drei Möglichkeiten zur Verfügung: als erstes die direkte Phosphorylierung über die Triosekinase zu Phosphoglyzerinaldehyd, als zweites die Reduktion zu Glyzerin und schließlich die Oxydation zu Glyzerinsäure, ein Schritt, der beim Menschen wohl von geringerer Bedeutung ist, zumal in seiner Leber die Glyzeratkinase fehlt (im Gegensatz zur Ratte, wo eine direkte Phosphorylierung zu Glyzerophosphat möglich ist) (38). Die Abbauprodukte der Fruktose treten auf der Stufe der Triosen in die Glykolysekette ein. So ist die weitgehende Insulinunabhängigkeit des Fruktose- bzw. Sorbitstoffwechsels zu erklären. Da Fruktokinase bisher nur in der Leber, der Niere und im Darm nachgewiesen wurde, kann Fruktose in anderen Geweben nur durch Hexokinase phosphoryliert werden, deren Affinität zu Fruktose in Anwesenheit von

Glukose gering ist. Wegen der besonders hohen Affinität der spezifischen Enzyme zu Fruktose ist die Leber wichtigstes Organ für dessen Umsatz (52). Der fünfwertige Alkohol Xylit ist ein Intermediärprodukt des Glukuronsäure-Xylulose-Zyklus (Lit. bei 52, 53). Dort erfolgt eine Metabolisierung von L-Xylulose in D-Xylulose über Xylit. Exogen zugeführtes Xylit wird in der Hauptsache neben einer anderen Möglichkeit, der NADP-abhängigen Dehydrogenierung zu L-Xylulose, von der recht aktiven Polyol-Dehydrogenase in der Leber zu D-Xylulose oxydiert. Die ATP-abhängige Phosphorylierung zu D-Xylulose-5-Phosphat verbindet den sogenannten Glukuronsäureweg mit dem Pentose-Phosphat-Zyklus. D-Xylulose-5-Phosphat wird vollständig in Fruktose-6-Phosphat und Glyzerinaldehydphosphat übergeführt und kann so in die Glykolysekette eingeschleust werden. Die Aktivität der Xylit-Stoffwechselwege vermag nach Lang ohne weiteres, 10 - 15 % des Kalorienbedarfs durch Xylit zu decken (47).

Viele Untersuchungen der letzten Jahre wurden angestellt, um die Wirkung der Zuckeraustauschstoffe auf den Leberstoffwechsel zu ergründen. Beim Tier zeigte sich, daß die Leber von der angebotenen Fruktose etwa 50 % extrahiert und sie mit Hilfe der Ketohexokinase sofort zu Fruktose-1-Phosphat phosphoryliert (71); ein Vorgang der viermal schneller verläuft als die Phosphorylierung der Glukose (38). Kürzliche Untersuchungen am Menschen bestätigten den Tierbefund: das Splanchnikusgebiet extrahiert vom arteriellen Fruktoseangebot etwa 55 % (23). Von der aufgenommenen Fruktose werden zirka 50 % in die Glukoseneubildung und 25 % in das von der Leber abgegebene Laktat und Pyruvat eingeschleust (23). Die restlichen 25 % stehen entweder für die Glykogen- bzw. Triglyzeridsynthese oder für die Endoxydation zur Verfügung (23, 71). Isotopenversuche an Ratten mit radioaktiv markierter ^{14}C -Fruktose, -Sorbit und -Xylit ließen 10 Minuten nach intravenöser Injektion dieser Zuckerstoffe über 70 % von dem Kohlenstoff ^{14}C als ^{14}C -Glukose im Plasma wiederfinden. Nur ein geringer Teil war im Leberglykogen und Leberlipid enthalten. Im Verhalten der drei Zuckeraustauschstoffe untereinander waren dabei nur geringe Unterschiede zu beobachten: Xylit wurde bevor-

zugt in das Leberglykogen eingebaut (30).

Das Hauptprodukt bei der hepatischen Verwertung aller drei Zuckeraustauschstoffe ist neben Laktat Glukose. Um so mehr verwundert es, daß bei Infusionen von Fruktose, Sorbit und Xylit die Blutzuckerwerte nicht bzw. nicht wesentlich ansteigen (9, 16, 23, 28, 36, 37). Einige Autoren machen dafür einen meßbaren, wenn auch geringen Insulineffekt verantwortlich, der die anfänglich leicht ansteigende Blutglukose senkt und in der Leber die Glykogensynthese anregt (16, 23, 30). Andere vermuten eine verzögerte Glukoseabgabe von der Leber, sowie eine gesteigerte, möglicherweise insulinunabhängige, periphere Glukoseutilisation (36). Dem stehen Tierversuche von Froesch gegenüber, die zwar die Bildung der Glukose aus den Zuckeraustauschstoffen in der Leber vom Insulin unabhängig erscheinen ließen, jedoch nicht ihre weitere Metabolisierung von insulinsensitiven Geweben wie Muskel- und Fettgewebe (30). Eine weitere Erklärung für die relativ konstanten Blutglukosewerte wäre die Hypothese von Randle, die besagt, daß das Absinken der Konzentration der freien Fettsäuren die periphere Glukoseverwertung steigert (63). Solch ein Absinken ist bei Dauerinfusion und bei oraler Verabreichung von Fruktose, Sorbit und Xylit ohne eine wesentliche Beeinflussung des Seruminsulins stets deutlich feststellbar (16, 23, 28, 36, 37, 53). Weitere Veränderungen im Blut seien im folgenden nun kurz vergleichend angeführt. Konzentrationsabhängig kommt es beim Menschen nach Infusionen von Zuckeraustauschstoffen aufgrund der bereits geschilderten Verwertung in der Leber zu einer Erhöhung des Blutlaktats, die am stärksten nach Fruktose- und Sorbit-, am schwächsten nach Xylitverabreichung ausgeprägt ist (9, 16, 28, 36, 37, 53). Der Laktat/Pyruvat-Quotient kann als Ausdruck des Redoxpotentials der Leber nach Fruktose- und Sorbitinfusion in einer Dosierung von 0,5 - 0,8 g/kg Körpergewicht und Stunde auf etwa das Doppelte ansteigen (3, 28, 36). Bei der Dosierung 0,5 g pro kg/h von Fruktose und Xylit fällt das Standardbikarbonat parallel zum Laktatanstieg ab (9). Bei der Dosierung von 0,25 g/kg/h bleibt das Bikarbonat unverändert (9). Unbestritten ist der Blut-Harnsäureanstieg nach Verabreichung von Fruktose, Sorbit und

Xylit (28, 29, 37, 43, 53, 72). Bei parenteraler Verabreichung der Zuckeraustauschstoffe in üblicher Dosierung (um 0,5 g/kg/h) werden jedoch obere Normgrenzen nicht überschritten. Die höchsten Harnsäurewerte im Blut werden bei kontinuierlicher Infusion von Xylit beobachtet. So berichtet Kaiser bei einer Dosierung von 0,3 - 0,5 g pro kg Körpergewicht und Stunde von einem raschen und lang anhaltenden Serumharnsäureanstieg um etwa + 15 bis + 50 % (43). Haslbeck fand bei einer parenteralen Xylit-Verabreichung von 0,5 g/kg/Stunde bereits nach 30 Minuten einen Harnsäureanstieg zwischen 1,5 und 2 mg/100 ml, der während der Infusion andauerte. Vergleichsweise waren die Werte bei gleicher Dosierung von Fruktose und Sorbit nur mäßig mit durchschnittlich 0,5 mg/100 ml erhöht (37). Als letztes sei der passagere Abfall des anorganischen Phosphats im Blut erwähnt (28, 53). Er scheint Ausdruck eines gesteigerten Energieumsatzes zu sein. Auch hier hat Xylit die ausgeprägteste Wirkung von den drei Zuckeraustauschstoffen. Nach Absetzen der Infusion wird der Ausgangswert der anorganischen Phosphat-Konzentration am schnellsten nach Fruktose-Infusionen erreicht (28). Interessant ist es, am Beispiel des Serum-Phosphats den Unterschied zwischen einer akuten und einer mittel-langfristigen Verabreichung z. B. von Xylit zu verfolgen. So zeigt eine 100minütige Stoßinfusion von 50 g Xylit einen deutlichen Phosphatabfall (53). Bei einer zweiwöchigen oralen Verabreichung von täglich 50 g Xylit nach einer siebentägigen Adaptionszeit wurde bis zum 7. Versuchstag sogar ein Anstieg des anorganischen Phosphats im Serum beobachtet. Der erhöhte Phosphatspiegel wurde in den folgenden 7 Tagen aufrechterhalten. Nach Absetzen von Xylit stellte sich die Phosphatausgangskonzentration langsam wieder ein (54). Aus diesen Werten wird die Anpassungsfähigkeit des menschlichen Organismus deutlich, der die erhöhten Phosphatumsätze mit vermehrter Phosphatnachlieferung beantwortet.

Eine Erscheinung, vor der in letzter Zeit bei der Infusionstherapie besonders mit Fruktose und Sorbit gewarnt wird, ist der Abfall energiereicher Phosphate, vor allem des ATP, in der Leber (14, 15, 50, 62, 82, 83). Als erster berichtete Mäenpää über

einen deutlichen Abfall von ATP, begleitet von einem Abfall auch des anorganischen Phosphats in der Rattenleber nach einmaliger intravenöser Gabe etwas größerer Dosen von Fruktose (50). Dieser Befund wurde durch andere Gruppen bestätigt (15, 62, 82, 83). Im Tierexperiment konnte Bode eine Dosisabhängigkeit des ATP-Verlusts und der Abnahme des Gesamtgehalts an Adenosinphosphaten zeigen (15). Bereits durch Gabe von 0,2 g Fruktose/kg Körpergewicht i.v. kam es zu einer signifikanten Abnahme beider Größen. Die Gabe von 1,5 g Fruktose/kg i.v. führte zu einem Abfall auf 30 % des normalen ATP-Gehalts. Auch in der menschlichen Leber trat nach Infusion von 0,6 - 0,8 g Fruktose oder Sorbit pro kg Körpergewicht in 30 - 45 Minuten ein deutlicher Verlust an ATP (auf 50 %) und Gesamtadenosinphosphaten (auf 65 %) ein (15). Die Gabe äquimolarer Mengen Glukose brachte dagegen keine wesentlichen Veränderungen (15). Viele Bestrebungen der letzten Jahre galt es, der Ursache dieses Abfalls an Leber-ATP und -Gesamtadenosinphosphaten näher zu kommen.

Fruktose wird - wie schon berichtet - in einer ATP verbrauchenden Reaktion durch Ketohexokinase zu Fruktose-1-Phosphat phosphoryliert und somit in den Stoffwechsel der Leber eingeschleust. Diese rasche Phosphorylierung bringt den beobachteten ATP- und anorganischen Phosphat-Abfall in der Leber mit sich (15, 62, 83). Anorganisches Phosphat wird an Zwischenprodukte des weiteren Fruktoseabbaus gebunden und zur Neubildung von ATP benötigt. Die intrazelluläre Konzentrationserniedrigung an anorganischem Phosphat in der Leber spiegelt sich vorübergehend in einem Abfall des Blutphosphatspiegels wider (14). Die gleichartige Wirkung von Sorbit auf den ATP-Gehalt der Leber ist verständlich, da Sorbit durch die Sorbitdehydrogenase rasch in Fruktose umgewandelt wird (13). Anhäufung von phosphorylierten Zwischenprodukten in der Leberzelle wie Fruktose-1-Phosphat und α -Glyzerophosphat weisen im Vergleich zur schnellen Aufnahme von Fruktose und Sorbit auf eine weitere verzögerte Verwertung dieser Substanzen hin (15, 83). Beachtenswert ist die deutliche Abnahme des Gehalts an Gesamtadenosinphosphaten (= Summe von ATP, ADP und AMP) in der Leber (15, 62, 83), weil unter anderen Bedingungen eines ATP-Verlustes in der Leber, wie z. B. bei Anoxie oder in Gegenwart von Entkopp-

lern der oxydativen Phosphorylierung, der Gehalt an ADP und AMP ansteigt und damit der Gesamtadenosinphosphatgehalt unverändert bleibt (14). Eine mögliche Erklärung auf enzymatischer Basis bietet sich an. Im Arbeitskreis von Krebs wurde entdeckt, daß die beiden möglichen Abbauewege für Adenosinmonophosphat (AMP) durch ATP und anorganisches Phosphat gehemmt werden (83). Dabei hemmt ATP die 5-Nukleotidase und das anorganische Phosphat die AMP-Deaminase. Der nun unter Fruktose und Sorbit beobachtete ATP- und anorganische Phosphat-Abfall in der Leberzelle führt folgerichtig über eine Entthemmung zu einer Aktivitätssteigerung der AMP-abbauenden Enzyme. Woods konnte bei seinen Studien an perfundierter Rattenleber mit 10 mM D-Fruktose einen 7fachen Anstieg des Inosinmonophosphats (IMP), einem Zwischenprodukt des Purinkatabolismus, nachweisen (83). Bode fand bei gleichzeitiger Gabe äquimolarer Mengen von anorganischem Phosphat zusammen mit Fruktose einen verminderten Abfall des Gesamtadeninphosphatgehaltes in der Leber, obgleich die Abnahme des ATP-Gehaltes unbeeinflußt geblieben ist (15). Beides gilt als ein weiterer Beleg für die Richtigkeit der oben genannten Hypothese vom Fruktose und Sorbit indirekt induzierten, über den ATP- und anorganischen Phosphat-Abfall bewirkten, verstärkten Abbau der Adenin-nukleotide (15, 62, 82, 83).

Ist der AMP-Abbau in der Leber gesteigert, so ist auch mit einer gesteigerten Bildung von Adenosin, Inosin und eventuell Hypoxanthin, Harnsäure und Allantoin zu rechnen (83).

Schon 1969 berichtete Mäenpää von einem deutlichen Anstieg der Allantoin-Produktion einer mit Fruktose perfundierten Rattenleber (62). Fox und Kelley hatten dann nach rascher (0,5 g/kg in 10 Minuten) intravenöser Fruktoseinfusion beim Menschen einen vorübergehenden Harnsäureanstieg im Plasma sowie einen Anstieg in der Ausscheidung von Oxypurinen und Harnsäure über die Niere gefunden (29). Untersuchungen am Affen zeigten vergleichbare Ergebnisse (72). Dabei stellte man fernerhin fest, daß sich die anfängliche Harnsäurevermehrung im Plasma und im Urin trotz weiter steigender Fruktosekonzentration im Blut zurückbildete. Die Harnsäureclearance war zwar nach Infusionsbeginn erhöht,

stieg aber trotz progressiv ansteigender Glykosurie nicht weiter mit an (72). Isotopen-Studien mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Harnsäure demonstrierten einen prompten Anstieg im Harnsäure-Pool, der sich im Anstieg seiner Umsetzungsrate manifestierte, was heißt, daß nur neu synthetisierte, endogene Harnsäure in die Zirkulation gekommen sein kann (72). Simkin sieht in diesen Ergebnissen eine Übereinstimmung mit dem Konzept, daß von einem möglichen Pool aus vorgebildeten Purinen durch rasche Umwandlung Harnsäure entsteht (72). Ist der Pool erschöpft, so kann auch keine neue Harnsäure gebildet werden, trotz weiterem Fruktoseanstieg im Blut, was die obigen Ergebnisse erklären würde. Vermutlich führt die anfänglich rasche Phosphorylierung der Fruktose in der Leber indirekt zum ebenfalls raschen Katabolismus von verfügbaren Adenosinnukleotiden unter Bildung von Harnsäure und Allantoin (15, 29, 62, 72).

Eine gesteigerte Purinsynthese (29, 43) oder eine verminderte Ausscheidung über die Nieren (29, 40, 72) sind als Ursache der durch Fruktoseinfusion bedingten Hyperurikämie weniger wahrscheinlich. Ein unter Xylit- und Fruktoseinfusion festgestellter intraerythrozytärer Abfall des 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphats (PRPP), das eine kritische Rolle bei der Regulation des menschlichen Purinstoffwechsels spielt, weist eher auf einen hohen Verbrauch von PRPP bei der Reutilisierung der Purinbasen Hypoxanthin, Guanin und Adenin hin (29, 43). Der vermehrte Einbau von PRPP im Reutilisierungsstoffwechsel ist damit ein Hinweis für den Versuch der Zellen, verlorengegangene Nukleotide (vor allem ATP, ADP und AMP) durch Wiederaufbau zu IMP zu erhalten.

Für Syntheseleistungen in der Leberzelle ist ein ausreichendes Angebot an energiereichem Phosphat (ATP) sehr wichtig. Fruktose provoziert einen Abfall von energiereichem Phosphat in der Leber und vermag vielleicht aus diesem Grunde, energieabhängige Syntheseleistungen in der Leberzelle zu hemmen. Mäenpää konnte bei Infusion höherer Dosen von Fruktose eine gehemmte Proteinsynthese, gemessen am (verminderten) Einbau von C^{14} -Leuzin, an der Ratte-leber nachweisen (50). Auch Bode berichtete bei seinen Versuchen (Fruktoseinfusion 1,6 g/kg) von einer derartigen Hemmung (15): die Einbaurate von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -D,L-Leuzin in das Protein der Rat-

tenleber fiel innerhalb von 10 Minuten auf 35 % des Ausgangswertes ab. Die Synthese von Ribonukleinsäure, gemessen am Einbau von 6-¹⁴C-Orotsäure, war ebenfalls in der regenerierenden Rattenleber durch Fruktose signifikant vermindert (15). Elektronenmikroskopische Änderungen in der Leberzelle durch intravenöse Fruktosegabe können vielleicht als morphologisches Äquivalent der unter dem ATP-Verlust beobachteten Hemmung synthetischer Prozesse (z. B. RNS- und Proteinsynthese) erklärt werden (14). Beobachtet wurden sowohl in der Leber des Menschen als auch in der Rattenleber 30 Minuten nach intravenöser Injektion von 1,6 g Fruktose/kg Körpergewicht eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums mit deutlicher Vesikelbildung, eine Störung der normalen Struktur des rauen endoplasmatischen Retikulums mit Ribosomenverlust, eine Zunahme der Zahl an Lysosomen und Membranveränderungen (14).

Interessant sind Beobachtungen bei Patienten mit hereditärer Fruktoseintoleranz, die unter einem Mangel an Fruktose-1-Phosphat-Aldolase leiden. Hier führt bereits die Zufuhr kleiner Fruktosemengen schon zu Änderungen biochemischer Parameter (starker Abfall des anorganischen Phosphats und ausgeprägter Anstieg des F-1-P-Gehalts in der Leber), wie sie sonst bei Stoffwechselgesunden nur unter hohen Fruktosedosen bekannt wurden. Untersuchungsmaterial aus Leberbiopsien solcher Patienten bestätigte unter dem Elektronenmikroskop, daß die beim Gesunden erst unter höheren Fruktoseinfusionsdosen aufgetretenen morphologischen Veränderungen hier schon nach niedriger Dosierung beobachtet werden konnten.

Abschließend sei noch erwähnt, daß bei Patienten mit benigner Fruktosurie weder Veränderungen im Serum noch Veränderungen im Harn, wie sie weiter oben beschrieben wurden, während beliebig hoher intravenöser Fruktosegaben bekannt geworden sind (72).

DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE

Die von uns durchgeführten Infusionen von Sorbit und Fruktose beim Menschen in einer Dosierung von 0,5 g pro kg Körpergewicht und Stunde über einen Zeitraum von 180 Minuten bestätigten Veränderungen einiger Blutparameter, die bereits in der Literatur beschrieben und verschieden gedeutet worden sind. So blieb die Blutglukose-Konzentration im Laufe der dreistündigen Infusionsdauer relativ konstant (9, 16, 23, 28, 36, 37), die freien unveresterten Fettsäuren zeigten einen deutlichen Abfall (16, 23, 28, 36, 37, 53) und die infundierten Substanzen Fruktose und Sorbit stellten sich auf ein konstantes erhöhtes Niveau ein (9, 23, 39) (Abbildung 1). Diese Werte werden durch eine direkte Wirkung der Zuckeraustauschstoffe erklärt, mit oder ohne einer gewissen Insulinbeteiligung, die aufgrund der anfänglich großen Glukoseproduktion der Leber und dem daraus resultierenden minimalen peripheren Glukoseanstieg gemessen werden kann (23, 36). Die gesicherte Abnahme von ATP und anorganischem Phosphat in der Leberzelle (14, 15, 50, 62, 82, 83) aufgrund der raschen Phosphorylierung der Fruktose in der Leber spiegelt sich in dem erniedrigten Serum-Phosphatspiegel wider. Ersteres bewirkt auch zum Teil über die Enthemmung der AMP-abbauenden Enzyme den Anstieg der Harnsäure im Blut (siehe vorhergehendes Kapitel). Die spezielle Metabolisierung von Sorbit und Fruktose in der Leber, in der die anfänglich hohe Glukoseproduktion unter anderem zugunsten der Laktatbildung abnimmt (23), erklärt das Ansteigen des Laktat/Pyruvat-Quotienten. Die NAD-verbrauchende Dehydrierung von Sorbit zu Fruktose (13) gibt vielleicht einen Hinweis auf die erhöhten Werte des Laktat-Pyruvat-Verhältnisses von Sorbit gegenüber der Fruktose (Abbildung 2).

Auffallend war dagegen die deutliche Abnahme der intraerythrozytären 2,3-DPG-Konzentration in den ersten 30 Minuten nach Infusionsbeginn um 25 %, die 21 Stunden nach Absetzen der Infusion immer noch nicht ihren Ausgangswert erreicht hatte. Die ATP-Konzentration dagegen in der roten Blutzelle war in Übereinstimmung mit Fox und Kelley (29) und Heuckenkamp (40) nicht signifi-

kant verändert. Der 2,3-DPG-Abfall bedeutet theoretisch eine Verminderung der peripheren Sauerstoffversorgung, da erniedrigte 2,3-DPG-Spiegel im Erythrozyten die Sauerstoffbindungskurve nach links verschieben und somit die Sauerstoffabgabe vom Hämoglobin reduzieren. Zu den bekannten Nebenwirkungen Hyperurikämie, Hyperlaktatazidämie und ATP-Abfall in der Leber bei Fruktose- oder Sorbit-Infusionen käme die periphere Sauerstoffminderversorgung hinzu (15, 29, 62, 82, 83).

Die Fruktose- und Sorbit-Konzentration im Erythrozyten steigt nach der Infusion in etwa proportional dem Anstieg im Gesamtblut. Es wäre also möglich, daß die beiden Zuckeraustauschstoffe in Analogie zu den bekannten hepatischen Veränderungen (15, 62, 82, 83) nach intravenöser Zufuhr auch einen gesteigerten erythrozytären Abbau von Adeninnukleotiden verursachen könnten, der dann auf Kosten von 2,3-DPG kompensiert wird. In-vitro-Inkubationen unter Zugabe von Fruktose, Sorbit und auch von Xylit bis 200 mg/100 ml - Konzentrationen also, die bei Infusionsversuchen im Blut keinesfalls erreicht werden - zeigten keine Auswirkung auf den erythrozytären 2,3-DPG- oder ATP-Gehalt (Tabelle 1 - 3). Man kann also annehmen, daß ein direkter Effekt der Zuckeraustauschstoffe, wie er in der Leber beobachtet werden kann, auf den Erythrozyten-Stoffwechsel nicht existent ist. Aus diesem Grunde sind indirekte Mechanismen anzunehmen, die für die beobachtete Verminderung des erythrozytären 2,3-DPG verantwortlich sind.

Der deutliche Anstieg des Laktat-Pyruvat-Quotienten im Blut, der stets bei Fruktose- und Sorbit-Infusionen über 0,25 g/kg Körpergewicht und Stunde beobachtet werden kann, verschiebt womöglich intrazellulär die Beziehung von NADH zu NAD in Richtung NADH. Eine erniedrigte NAD-Konzentration verlangsamt den Glykolysefluß im Erythrozyten an der Glyzerinaldehyd-Dehydrogenase und 1,3-DPG als limitierendes Substrat der 2,3-DPG-Synthese würde reduziert gebildet (68, 69). Ebenso jedoch, wie bei den Inkubationsversuchen mit Fruktose, Sorbit und Xylit, beeinflusste auch hier eine in-vitro-Erhöhung des Laktat/Pyruvat-Quotienten von 10 : 1 auf 40 : 1 bei gleichem pH die Konzentration des erythro-

zytären 2,3-DPG und ATP nicht (Tabelle 4, 5). Dabei ist zu bemerken, daß ein Anstieg des Laktat/Pyruvat-Quotienten auf 40 : 1 unter in-vivo-Bedingungen nach Fruktose- und Sorbit-Infusionen bei weitem nicht erreicht wird.

Das anorganische Phosphat im Serum nahm während intravenöser Fruktose- und Sorbit-Verabreichung kontinuierlich um maximal 25 % ab, wahrscheinlich als Konsequenz der vorhin beschriebenen hepatischen Veränderungen (15, 62, 82, 83). Ein Absinken des anorganischen Phosphats im Serum wurde in vitro durch Verdünnen des Bluts im Verhältnis 1 : 5 nachgeahmt und damit ein 80prozentiger Abfall der Phosphatausgangskonzentration erreicht. Im Verlauf einer vierstündigen Inkubation nahm der Erythrozytengehalt an 2,3-DPG um 10 % ab, während der ATP-Spiegel konstant blieb (Abbildung 5). Vergleicht man den raschen 2,3-DPG-Abfall in vivo mit der nur allmählich eintretenden Phosphat-Erniedrigung im Serum um maximal 25 % nach den Fruktose- und Sorbit-Infusionen und den 80prozentigen Phosphatabfall mit der nur geringen 2,3-DPG-Erniedrigung über 4 Stunden in vitro, dann können die in vivo beobachteten Phosphatveränderungen nur zu einem geringen Teil den Effekt auf das Verhalten des 2,3-DPG erklären. Die Ergebnisse des in-vitro-Versuchs stehen dagegen nicht im Widerspruch zu dem bekannten Langzeit-Effekt von Phosphat-Mangel auf das erythrozytäre 2,3-DPG (49, 64).

Intraerythrozytäre pH-Verschiebungen wirken sich kritisch auf die Glykolyse des Erythrozyten aus. Eine pH-Erniedrigung führt zu einer Abnahme in der 2,3-DPG-Konzentration, da sowohl die Phosphofruktokinase als auch die Diphosphoglyzerat-Mutase stark pH-abhängig reagieren (68, 69). Eine 2,3-DPG-Erniedrigung in der roten Blutzelle während einer Azidose, z. B. der diabetischen Ketoazidose, ist schon vor der physiologischen Bedeutung des 2,3-DPG bekannt gewesen. In der Tat, bei einer Gruppe von 8 Personen, die alle Fruktose infundiert bekamen, wurde ein pH-Abfall mit einem gleichzeitigen Absinken des aktuellen Bikarbonats gefunden (Abbildung 4). Der Bikarbonatabfall stimmt gut mit den gefundenen Werten von Berg und Mitarbeitern (9) überein; hingegen die pH-Veränderungen sind bis jetzt aus der Literatur nicht

bekannt. Nach Bellingham (5) resultiert eine pH-Verschiebung von 0,01 in einer 5 %igen erythrozytären 2,3-DPG-Veränderung. Legt man dieser Berechnung die von uns im Durchschnitt gefundenen pH-Erniedrigungen von 0,06 zugrunde, so berechnet sich eine 2,3-DPG-Abnahme im Erythrozyten von ungefähr 30 %, die mit den von uns gefundenen Werten nach Fruktose- und Sorbit-Infusionen gut übereinstimmt.

Will man aus diesem pH-induzierten intraerythrozytären 2,3-DPG-Abfall Schlußfolgerungen ziehen, so ist zu bedenken, daß der pH nicht nur den 2,3-DPG-Metabolismus beeinflusst, sondern auch die Sauerstoffaffinität an das Hämoglobin. Eine pH-Erniedrigung führt zu einer Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach rechts. Gleichzeitig verursacht der erniedrigte pH im Erythrozyten eine Abnahme der 2,3-DPG-Konzentration, die ihrerseits die Dissoziationskurve in die entgegengesetzte Richtung verschiebt, nämlich nach links. In Anbetracht dieser gegensätzlichen Wirkung kann man annehmen, daß die Sauerstoff-Freisetzung während der Infusionszeit von Fruktose und Sorbit in den peripheren Geweben unverändert bleibt, allerdings aufgrund einer geringen doch signifikanten Verschiebung des Blut-pH in Richtung Azidose.

In einer abschließenden Beurteilung unserer Versuchsergebnisse für Klinik und Praxis gilt zu berücksichtigen, daß die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft für die Zuckeraustauschstoffe Fruktose und Sorbit eine Maximaldosis von 0,25 g/kg Körpergewicht und Stunde empfiehlt, unsere Versuche aber alle mit der doppelten Infusionsgeschwindigkeit, mit 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde durchgeführt wurden. Wir stellten bei Fruktoseinfusionen mit 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde eine anfänglich, klinisch aber kaum relevante pH-Erniedrigung fest. Berg (9) hingegen, der Fruktose in einer Konzentration von 0,25 g/kg Körpergewicht und Stunde infundierte, fand bei seinen Versuchen über 6 Stunden das aktuelle Bikarbonat und den L/P-Quotienten unverändert. Man kann also sagen, daß Fruktose- wie Sorbit-Infusionen bei höherer Dosierung ($> 0,25$ g) wohl eine pH-Verschiebung ins Saure bewirken, bei entsprechender Dosierung ($< 0,25$ g) aber keine klinische Relevanz zeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Veröffentlichungen jüngster Zeit ist bekannt, daß Fruktose-Infusionen beim Menschen und an isolierter Rattenleber eine Erniedrigung der ATP-Konzentration in der Leber und einen Anstieg der Harnsäure-Produktion bewirken. Die Ursache dafür wird in einem indirekt gesteigerten Abbau von Adeninnukleotiden gesehen. Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, den Einfluß von Fruktose- und Sorbit-Infusionen auf die ATP- und 2,3-DPG-Spiegel in den Erythrozyten von Normalpersonen zu untersuchen. Dazu wurden Gesunde mit Fruktose ($n = 9$) oder Sorbit ($n = 6$) in einer Konzentration von 0,5 g/kg Körpergewicht und Stunde infundiert. Entgegen den oben genannten Leberversuchen blieben bei unseren Untersuchungen die ATP-Konzentrationen in den Erythrozyten unverändert; die erythrozytären 2,3-DPG-Spiegel hingegen nahmen innerhalb der ersten 30 Minuten nach Infusionsbeginn um rund 25 % ab. Inkubations-Versuche mit Fruktose und Sorbit bis zu Konzentrationen von 200 mg/100 ml brachten keine Veränderungen in den erythrozytären 2,3-DPG- und ATP-Spiegel. Da Fruktose und Sorbit durch die Erythrozytenmembran frei diffundierbar ist, mußte ein direkter Mechanismus für die Fruktose- und Sorbit-induzierte 2,3-DPG-Abnahme im Erythrozyten ausgeschlossen und ein indirekter Mechanismus angenommen werden. Eine Erhöhung des L/P-Quotienten *in vitro* von 10 : 1 auf 40 : 1 bei konstantem pH von 7,40 veränderte die 2,3-DPG-Spiegel im Erythrozyten nicht. Eine Erniedrigung des anorganischen Phosphats im Inkubationsmedium um 80 % auf 20 % der Ausgangskonzentration brachte einen langsamen 2,3-DPG-Abfall um 10 % binnen 3 Stunden, konnte aber die *in-vivo*-Veränderungen der anfänglich raschen 2,3-DPG-Erniedrigung nicht zufriedenstellend erklären. Die bei Fruktose-Infusionen ($n = 8$) beobachteten pH-Veränderungen können eine Erklärung hierfür geben: innerhalb von 10 Minuten nach Beginn der Fruktose-Infusion war der venöse Blut-pH von einem Ausgangswert von 7,42 auf 7,38 und nach 60 Minuten auf 7,36 abgesunken. Gleichzeitig verminderte sich das aktuelle Bikarbonat von 25 auf 19,5 mval/l nach 60 Minuten. Ein derartiger pH-Abfall bedingt übereinstimmend mit Ergebnissen aus der Literatur eine 20- bis 30prozentige Reduktion der erythrozytären 2,3-DPG-Konzentration.

Verminderte 2,3-DPG-Spiegel im Erythrozyten verschieben die Sauerstoffbindungskurve nach links, und umgekehrt erniedrigte pH-Werte diese nach rechts. Es ist also anzunehmen, daß die Sauerstoffversorgung der peripheren Gewebe unter Fruktose-Infusionen nicht wesentlich verändert ist. Klinische Auswirkungen während und nach Fruktose- und Sorbit-Infusionen sind nicht zu erwarten, da die von uns angewandte Dosierung die von der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft empfohlenen Dosis von 0,25 g/kg Körpergewicht und Stunde um das Doppelte überstieg.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Arnone, A.
Nature, 237, 146 (1972)
- (2) Askari, A. and Rao, S.N.
Regulation of AMP deaminase by 2,3-diphosphoglyceric acid:
a possible mechanism für the control of adenine nucleotide
metabolism in human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 151, 198 (1968)
- (3) Astrup, P., Garby, L., De Verdier, C.-H.
Displacements of the oxyhemoglobin dissociation curve.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 171 - 176 (1968)
- (4) Astrup, P., Rörth, M. and Thorshauge, C.
Dependency on acid-base status of oxyhemoglobin dissociation
and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 26, 47 (1970)
- (5) Bellingham, A.J., Detter, J.C. and Lenfant, C.
Regulatory mechanism of hemoglobin oxygen affinity in aci-
dosis and alkalosis.
J. clin. Invest. 50, 700 (1971)
- (6) Benesch, R., Benesch, R.E.
The effekt of organic phosphates from the human erythro-
cyte and the allosteric properties of hemoglobin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 162 (1967)
- (7) Benesch, R., Benesch, R.E. and Yu, C.I.
Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by
human hemoglobin.
Proc. Natl. Acad. Sci. 59, 526 (1968)
- (8) Benesch, R.E., Maeda, N. and Benesch, R.
2,3-diphosphoglycerate and the relative affinity of adult
and fetal hemoglobin for oxygen and carbon monoxide.
Biochem. Biophys. Acta, 257, 178 (1972)

- (9) Berg, G., Bickel, H., Matzkies, F.
Bilanz- und Stoffwechselverhalten von Fruktose, Xylit und Glucose sowie deren Mischungen bei Gesunden während sechs-stündiger parenteraler Ernährung.
Dtsch. med. Wschr. 98, 602 (1973)
- (10) Beutler, E.
General aspects of erythrocyte physiology and biochemistry.
Exp. Eye Res. 11, 261 (1971)
- (11) Beutler, E.
Inhibition of red cell enzymes by 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG).
J. of clin. Invest., Vol. 50, 7a, 24 (1971)
- (12) Beutler, E., Meul, A. and Wood, L.A.
Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in stored red blood cells.
Transfusion 9, 109 (1969)
- (13) Blakley, R.L.
The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase.
Biochem. J. 49, 257 (1951)
- (14) Bode, J. Ch.
Unerwünschte Stoffwechselwirkungen bei Gabe höherer Dosen von Fruktose und Sorbit.
Infusionstherapie 1, 558 (1973/74)
- (15) Bode, J.Ch., Zelder, O., Rumpelt, H.J., Wittkamp, U.
Depletion of liver adenosine phosphates and metabolic effects of intravenous infusion of fructose or sorbitol in man and in the rat.
Europ. J. clin. Invest. 3, 436 (1973)

- (16) Brodanová, M., Brodan, V., Kordač, V., Mareček, Z., Slabochová, Z., Kuhn, E.
Metabolic Reflection of Fructose Infusion in Cirrhotic Patients and the Effect of Tolbutamide and Butylbiguanide. *Acta Hepato-Gastroenterol.* 19, 116 (1972)
- (17) Busch, D.
Die Biochemie des Erythrocyten. Blut und Blutkrankheiten (Heilmeyer) 5. Auflage II. Band, 1. Teil, 580 - 622, Springer-Verlag, Berlin u. a. (1968)
- (18) Card, R.T. and Brain, M.C.
The "anemia" of childhood. Evidence for a physiologic response to hyperphosphatemia. *The New England J. of Med.* 22, 38 (1973)
- (19) Chanutin, A., Curnish, R.R.
Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 96 (1967)
- (20) Czok, R. und Lamprecht, W.
Methoden der enzymatischen Analyse 2. Auflage (Bergmeyer, H.U.) 1407, Verlag Chemie Weinheim (1970)
- (21) Darragh, J.H., Womersley, R.A., Meroney, W.H.
Fructose in the treatment of diabetic ketosis. *J. clin. Invest.* 32, 1214 (1953)
- (22) Deuticke, B., Duhm, J. and Dierkesmann, R.
Maximal elevation of 2,3-diphosphoglycerate concentrations in human erythrocytes: influence on glycolytic metabolism and intracellular pH. *Pflügers Arch.* 326, 15 - 34 (1971)

- (23) Dietze, G., Wicklmayr, M., Hepp, K.D., Grunst, J., Stiegler, G. und Mehnert, H.
Der Stoffwechsel des Splanchnikusgebiets unter dem Einfluß von Fruktose.
Infusionstherapie 1, 552 (1973/74)
- (24) Duncombe, W.G.
The colorimetric microdetermination of long chain fatty acids.
Biochem. J. 88, 7 (1963)
- (25) Feig, S.A., Segel, G.B., Shohet, S.B. and Nathan, D.G.
Energy metabolism in human erythrocytes.
J. of clin. Invest. 51, 1547 (1972)
- (26) Feig, S.A., Shohet, S.B. and Nathan, D.G.
Energy metabolism in human erythrocytes.
The Journal of clin. Invest. 50, 1731 (1971)
- (27) Förster, H., Haslbeck, M. und Mehnert, H.
Zur Bedeutung der Kohlenhydrate in der parenteralen Ernährung.
Infusionstherapie 1, 199 (1973/74)
- (28) Förster, H. und Zagel, D.
Stoffwechseluntersuchungen während und im Anschluß an Dauerinfusionen von Glucose und von Zuckeraustauschstoffen.
Dtsch. med. Wschr. 99, 1300 (1974)
- (29) Fox, I.H. and Kelley, W.N.
Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man.
Metabolism 21, 713 (1972)

- (30) Froesch, E.R., Zapf, J., Keller, U. and Oelz, O.
Comparative study of the metabolism of U-¹⁴C-fructose,
U-¹⁴C-sorbitol and U-¹⁴C-xylitol in the normal and the
streptozotocin-diabetic rat
J. clin. Invest. 2, 8 (1971)
- (31) Garby, L.
Non-equivalent oxygen-linked binding of protons, carbon-
dioxide and 2,3-diphosphoglycerate to human hemoglobin.
Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes (Gerlach et al.),
Georg Thieme Verlag, 160 (1973)
- (32) Gerlach, E., Deuticke, B. und Duhm, J.
Phosphat-Permeabilität und Phosphatstoffwechsel mensch-
licher Erythrozyten und Möglichkeiten ihrer experimentel-
len Beeinflussung.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 280, 243 (1964)
- (33) Gomorri, G.
J. Lab. clin. Med. 27, 955 (1942)
- (34) Hallmann, L.
Klinische Chemie und Mikroskopie, 10. Ed.
Verlag Georg Thieme, 591 (1966)
- (35) Hamasaki, N. and Minakami, S.
Studies on erythrocyte glycolysis, VIII. Kinetics of
2,3-diphosphoglycerate changes.
J. Biochem. 72, 981 (1972)
- (36) Haslbeck, M.
Zur parenteralen Verabreichung von Zuckeraustauschstof-
fen mit besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus.
Infusionstherapie 1, 569 (1973/74)
- (37) Haslbeck, M., Gerbitz, K. und Mehnert, H.
Untersuchungen zur Beeinflussung des Stoffwechsels durch
Mannit im Vergleich zu anderen Zuckern und Zuckeralkoholen.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 78, 1263 (1972)

- (38) Heinz, F., Lamprecht, W. und Kirsch, J.
Enzymes of fructose metabolism in human liver.
J. clin. Invest. 47, 1826 (1968)
- (39) Heuckenkamp, P.-U. und Zöllner, N.
Glucose in der parenteralen Ernährung
Infusionstherapie 1, 565 (1973/74)
- (40) Heuckenkamp, P.-U., Zöllner, N.
Über das Verhalten der Adenosinphosphate im Blut während
mehrstündiger intravenöser Fruktosezufuhr bei gesunden
Menschen.
Verh. d. Ges. f. Inn. Med. 79, 1188 (1973)
- (41) Hohorst, H.J.
Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Auflage (Bergmeyer, H.U.) 1425, Verlag Chemie Weinheim
(1970)
- (42) Jahrmärker, H.
Metabolism and membrane permeability of erythrocytes and
thrombocytes.
p. 19. (E. Deutsch, E. Gerlach and K. Moser, Eds.),
Plenum Press, New York (1968)
- (43) Kaiser, W., Stocker, K. und Heuckenkamp, P.-U.
Untersuchungen zum Mechanismus des Serumharnsäureanstiegs
während kontinuierlicher Xylitinfusionen.
Infusionstherapie 1, 548 (1973/74)
- (44) Karlson, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 7. Auflage, 242 - 247,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970)
- (45) Kortüm, M. und Kling, O.
Ärztl. Lab. 18, 33 (1972)
- (46) Lamprecht, W., Trautschold, J.
In Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage
(Bergmeyer, H.U.), 2024 - 2033, Verlag Chemie, Weinheim (1970)

- (47) Lang, K.
Xylit als Nahrungskohlenhydrat.
Med. u. Ernähr. 4, 45 (1963)
- (48) Lee, L.M.Y.
Purification and some properties of phosphofructokinase
from human erythrocytes.
Archives of Biochemistry and Biophysics 146, 607 (1972)
- (49) Lichtman, M.A. and Miller, D.R.
Erythrocyte glycolysis, 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration in uremic subjects: Relationship to extracellular phosphate concentration.
J. Lab. clin. Med. 76, 267 (1970)
- (50) Mäenpää, P.H., Raivio, K. and Kekomäki, M.P.
Liver adenine nucleotides: Fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis.
Science 161, 1253 (1968)
- (51) Marmier, P.
3^e Colloque International De Biologie De Saclay, Septembre 1963. Imprimerie des Presses Universitaires de France, Vendôme (France) 1964.
- (52) Mehnert, H.
Die Verwendung von Fruktose, Sorbit und Xylit im Handbuch des Diabetes mellitus Vol. II. E.F. Pfeiffer (ed.) p. 1069, München, J.F. Lehmanns Verlag 1971.
- (53) Mertz, D.P., Kaiser, V., Klöpfer-Zaar, M. und Beisbarth, H.
Fett- und Harnsäurestoffwechsel unter der akuten Wirkung von Xylit.
Klin. Wschr. 50, 1097 (1972)
- (54) Mertz, D.P., Kaiser, V., Klöpfer-Zaar, M. und Beisbarth, H.
Serumkonzentrationen verschiedener Lipide und von Harnsäure während 2wöchiger Verabreichung von Xylit.
Klin. Wschr. 50, 1107 (1972)

- (55) Miller, M., Murphy, J.R., Craig, J.W., Woodward, H.
Studies on experimental diabetic acidosis. Comparison of
effect of fructose and glucose in initial hours of treat-
ment.
J. clin. Endocr. 13, 866 (1953)
- (56) Miller, M.E., Rørth, M., Parving, H.H., Howard, D.,
Reddington, I., Valeri, C.R. and Stohlman, F.
pH effect on erythropoietin response to hypoxia.
The New England J. of Med. 5, 706 (1973)
- (57) Nygaard, S.F., Rørth, M.
An enzymatic assay of 2,3-diphosphoglycerate in blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 24, 399 (1969)
- (58) Omachi, A., Scott, C.B. and Hegarty, H.
Pyridine nucleotides in human erythrocytes in different
metabolic states.
Biochim. Biophys. Acta. 184, 139 (1969)
- (59) Paniker, N.V. and Beutler, E.
Pyruvate effect in maintenance of ATP and 2,3-DPG of
stored blood.
J. Lab. clin. Med. 78, 472 (1971)
- (60) Perutz, M.F.
Nature, 228, 726 (1970)
- (61) Praetorius, E. et al.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 273 (1953)
- (62) Raivio, K.O., Kekomäki, M.P., Mäenpää, P.H.
Depletion of liver adenine nukleotides induced by D-
fructose.
Biochem. Pharmac. 18, 2615 (1969)

- (63) Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N. and Newsholme, E.A.
The glucose fatty acid cycle, its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbance of diabetes mellitus. The Lancet I, 785 (1963)
- (64) Rapoport, S.
Stoffwechselregulation der roten Blutzelle
Folia Hämatol. 91, 298 (1965)
- (65) Rörth, M.
Dependency on acid-base status of blood of oxyhemoglobin dissociation and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes.
1. In vitro studies on reduced and oxygenated blood.
Scand J. clin. Lab. Invest. 26, 43 (1970)
- (66) Rörth, M.
Effects of some organic phosphate compounds on the oxyhemoglobin dissociation curve in human erythrocyte.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 22, 208 (1968)
- (67) Roigas, H., Dietze, F., Rapoport, S. und Sauer, G.
Über den Einfluß von Glycolyse-Zwischenprodukten auf die 2,3-PG-ase-Aktivität roter Blutzellen.
IV. Intern. Symp., Struktur und Funktion der roten Blutkörperchen, Berlin 1964.
Foliahaemat. (Lpz.) 83, 277 (1965)
- (68) Rose, I.A.
Regulation of human red cell glycolysis: a review.
Exp. Eye Res. II, 264 (1971)
- (69) Rose, Z.B.
Effects of salts and pH on the rate of erythrocyte diphosphoglycerate mutase.
Arch. Biochem. Biophys. 158, 903 (1973)

- (70) Schmidt, F.H.
Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander.
Klin. Wschr. 39, 1244 (1961)
- (71) Sestoft, L., Tenneson, K., Hansen, F.V. and Damgaard, S.E.
Fructose and glyceraldehyde metabolism in the isolated perfused pig liver.
Europ. J. Biochem. 30, 542 (1972)
- (72) Simkin, P.A.
Hexose infusions in cebus monkeys: effects on uric acid metabolism.
Metabolism 21, 1029 (1972)
- (73) Smith, Jr., L.H., Ettinger, R.H., Seligson, D.
A comparison of the metabolism of fructose and glucose in hepatic disease and diabetes mellitus.
J. clin. Invest. 32, 273 (1953)
- (74) Srivastava, S.K. and Beutler, E.
The effect of normal red cell constituents of the activities of red cell enzymes.
Archives of Biochem. and Biophys. 148, 249 (1972)
- (75) Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S.
The metabolic basis of inherited disease.
McGraw-Hill Book Comp. 2. Auflg. Kap. 45, 1038 - 1044 (1966)
- (76) Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S.
The metabolic basis of inherited disease.
McGraw-Hill Book Company, 2. Auflage Kap. 47, 1063 - 1066 (1966)
- (77) Standl, E., Kolb, H.
The effect of intravenous fructose and sorbitol infusions on erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) in man.
Europ. J. clin. Invest. 3, 270 (1973)

- (78) Torrance, J., Jacobs, P., Restrepo, A., Eschbach, J., Lenfant, C. and Finch, C.A.
Intraerythrocytic adaption to anemia.
New Engl. J. of Med. 283, 165 (1970)
- (79) Travis, S.F., Morrison, A.D., Clements, Jr., R.S., Winegrad, A.J. and Oski, F.A.
Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration.
J. of Clin. Invest. 50, 2104 (1971)
- (80) Valentine, W.N.
Introduction to discussion of regulation of erythrocyte glycolysis.
Exp. Eye Res. 11, 273 (1971)
- (81) West, C.D., Rapoport, S.
Modifikation of a colorimetric method for determination of mannitol and sorbitol in plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 70, 141 (1949)
- (82) Woods, H.F., Alberti, K.G.M.M.
Dangers of intravenous fructose.
The Lancet 2, 1354 (1972)
- (83) Woods, H.F., Egglestone, L.V., Krebs, H.A.
The cause of hepatic accumulation of fructose-1-phosphate on fructose loading.
Biochem. J. 119, 501 (1970)
- (84) Woodson, R.D., Torrance, J.D., Shappell, S.D. and Lenfant, C.
The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding.
J. of Clin. Invest. 49, 1349 (1970)
- (85) Yoshikawa, H. and Nakao, M.
Nucleotide metabolism and its relation to functions of preserved human erythrocyte.
Folia haemat. (Lpz.) 78, 248 (1962)

Herrn Prof. Dr. H. Mehnert, Direktor des Krankenhauses München-Schwabing, Chefarzt der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing und Leiter der Forschergruppe Diabetes, danke ich für die Überlassung des Themas und seine großzügige Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eberhard Standl, der mit großem Sachverstand mich in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens einführte, mir stets zuvorkommend mit Rat und Tat zur Seite stand und den raschen Fortgang meiner Arbeit ermöglichte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Kolb möchte ich herzlich danken für seine bereitwillige Unterstützung und wertvolle Hilfe bei chemischen und technischen Problemen.

LEBENS LAUF

Ich, Bernhard Rothenfußer, geb. am 4. Oktober 1948 in München als dritter Sohn des Ministerialdirigenten Gerhard Rothenfußer und seiner Ehefrau Irmgard Rothenfußer, geborene Gerritzen, besuchte von September 1954 bis Juli 1958 die Volksschule in München und von September 1958 bis Juli 1968 das Maximiliansgymnasium in München, an dem ich die Reifeprüfung ablegte.

Am 1. Oktober 1968 wurde ich zum Militärdienst bei den Panzerpionieren in München eingezogen. Nach 18 Monaten Wehrpflicht schied ich am 18. März 1970 als Fahnenjunker aus.

Am 10. April 1970 immatrikulierte ich mich an der Universität München in Humanmedizin, legte im April 1971 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1972 die ärztliche Vorprüfung und im Dezember 1975 die ärztliche Prüfung mit Erfolg ab.

Mit der Doktorarbeit begann ich im Februar 1973 und hoffe, im Frühjahr 1976 das Promotionsexamen ablegen zu können. Meine erste Stelle als Medizinalassistent habe ich am 7. Januar 1976 im Krankenhaus Tutzing angetreten.

